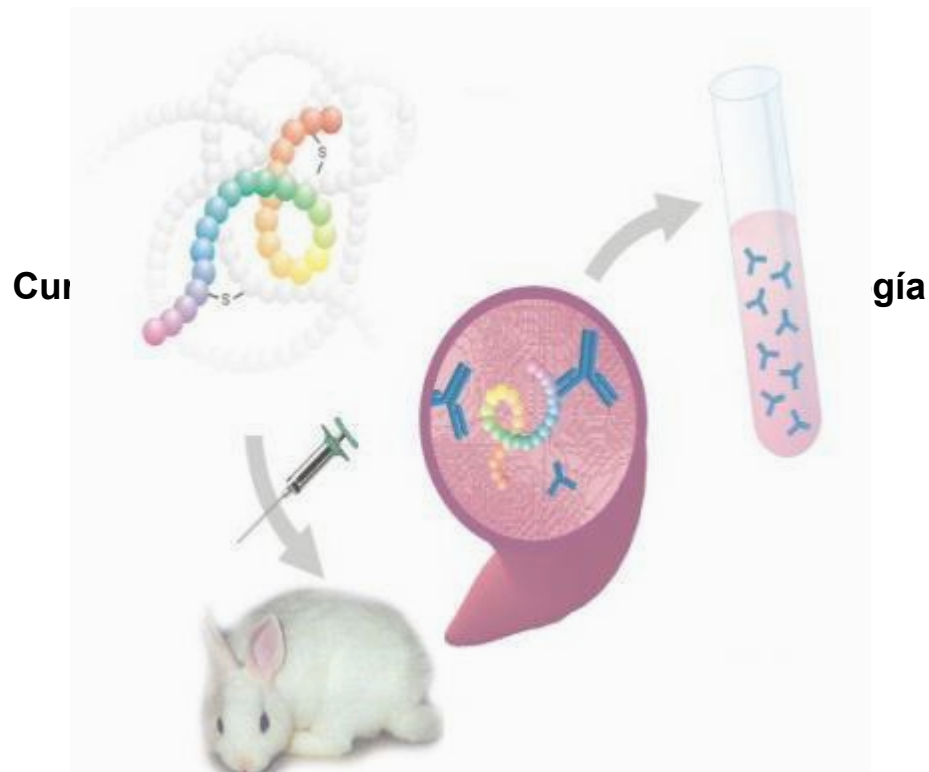




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



IBQ. Rocío Vanessa Calderón Pascacio

Coordinador del curso Dr. Roberto P. Stock Silberman

Cuernavaca, Morelos, Junio 2007

Contenido

Introducción	4
Historia de la inmunología	4
Anticuerpos	10
Antígenos	13
Interacción antígeno-anticuerpo	15
Anticuerpos monoclonales y policlonales	17
Técnicas inmunoquímicas	19
Técnicas de precipitación	21
Reacción de precipitación clásica	21
Técnica de precipitación	22
Técnica de difusión radial doble de Ouchterlony	23
Técnica de inmunoelectroforesis	23
Incremento de precipitación por inmunoelectroforesis con contracorriente	23
Técnica de difusión radial simple de Manzini (SRID)	24
Técnicas de aglutinación	25
Aglutinación de partículas recubiertas por antígeno	25
Hemoaglutinación directa	26
Hemoaglutinación indirecta	27
Técnicas de inmunofluorescencia	27
Citometría de flujo	29
Técnica de radioinmunoensayo	32
Técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA)	34
Nefelometría	36
Selección de células unidas a un anticuerpo	39
Purificación de antígenos y anticuerpos por cromatografía de afinidad	39
Inmunoprecipitación e inmunoblotting	40
Western blot, Dot blot y Slot blot	41
Detección específica de proteínas en filtros	43
Bloqueo de la membrana	43

Tinción de proteínas en el filtro	45
Colorantes	45
Tinción mediante biotina-estreptavidina	45
Tinción mediante oro coloidal	45
Análisis de interacciones moleculares (BIAcore)	46
Aplicaciones principales	47
Otras técnicas basadas en la unión antígeno-anticuerpo	47
Técnicas de biología molecular útiles en inmunología	48
Southern Blot	48
Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH: <i>Fluorescent In Situ</i> <i>Hybridization</i>)	49
FISH de Metafase	50
FISH de Interfase	50
PCR <i>in situ</i>	51
Mecanismo de la reacción	52
Bibliografía	53

Introducción

Para entender las técnicas inmunoquímicas, primero debemos comprender conceptos básicos sobre inmunología.

Los animales superiores son atacados por microorganismos y partículas extrañas. Pero poseen sistemas defensivos frente a tales patógenos; dichos mecanismos tienden a distinguir lo propio de lo extraño

La inmunidad es un conjunto de mecanismos de defensa de los animales frente a agentes externos extraños. Se adquiere al nacer, y va madurando y consolidándose durante los primeros años de vida.

La inmunología es la ciencia biológica que estudia todos los mecanismos fisiológicos de defensa de la integridad biológica del organismo. Dichos mecanismos consisten esencialmente en la identificación de lo extraño y su destrucción. La inmunología también estudia los factores inespecíficos que coadyuvan a los anteriores en sus efectos finales.

La respuesta inmune es la actuación integrada de un gran número de mecanismos heterogéneos de defensa contra sustancias y agentes extraños. En general, a las sustancias extrañas se las denomina como antígenos, y son ellos los que desencadenan en el organismo una serie de eventos celulares que provocan la producción de los mecanismos de defensa.

Historia de la inmunología

La inmunología es, en la actualidad, una ciencia autónoma y madura, pero sus orígenes han estado estrechamente ligados a la Microbiología. Su objeto consiste en el estudio de las respuestas de defensa que han desarrollado los animales frente a la invasión por microorganismos o partículas extraños, aunque su interés se ha volcado especialmente sobre aquellos mecanismos altamente evolucionados e integrados, dotados de especificidad y de memoria, frente a agentes reconocidos por el cuerpo como no propios, así como de su neutralización y degradación.

Como tantas otras ciencias, la Inmunología presenta un prolongado período pre-científico, de observaciones y aproximaciones meramente empíricas. Registro de enfermedades y de epidemias en los documentos épicos de Babilonia (Gilgamesh) y de las dinastías antiguas de Egipto. 2000 a.c, así como la variolización era una práctica habitual de la cultura china. 1000 a.C. La resistencia a ulteriores ataques de una enfermedad infecciosa fue ya recogida en escritos de la antigüedad; el historiador griego Tucídides (464-404 a.C.) narra que en una epidemia acaecida durante la guerra del Peloponeso, los enfermos eran atendidos solo por aquellos que habían sobrevivido previamente a la enfermedad, en la seguridad de que éstos no volverían a ser contagiados. Hipócrates propone alteraciones en el sistema de los humores para explicar las enfermedades y el humor maligno como causa de la peste (460-377 a.C).

Ya en el siglo X, Rhazes (medico islámico) describe clínicamente a la viruela y la diferencia de otras enfermedades eruptivas. Además establece que los sujetos que se recuperan de la enfermedad tienen una inmunidad prolongada (teoría de la inmunidad adquirida). Para el siglo XI Avicena propone que las enfermedades son transmitidas por semillas pequeñas, o gérmenes.

Igualmente, en la antigua China se había observado que las personas que en su niñez habían padecido la viruela no la adquirían más adelante en su vida. Los mismos chinos, en el siglo XI a. C., fueron los primeros en intentar una aplicación de estas observaciones que indicaban la inducción de un estado protector por medio de una forma suave de la enfermedad: la inhalación de polvo de escamas de viruela provocaba un ataque suave que confería resistencia ante infecciones posteriores. Una modificación fue introducida en Occidente en el siglo XVIII por Pylarini y Timoni, y fue popularizada en Gran Bretaña por Lady Mary Wortley Montagu, esposa del embajador inglés en Constantinopla, tras una serie inicial de pruebas sobre "voluntarios" (prisioneros). Sin embargo, este tipo de prácticas no llegaron a arraigar ampliamente, ya que no estaban exentas de riesgos, entre los cuales figuraba la posibilidad de transmisión de otras enfermedades.

En 1546 Fracastoro extiende la hipótesis de Avicena sobre el contagio de las enfermedades y de que la protección es común para varias enfermedades eruptivas. Se observa que el contacto del contenido de lesiones de viruela de las vacas (cow-pox), en los ordeñadores hacía que éstos no sufrieran la enfermedad. Hieronymus Mercurialis difiere de Fracastoro y dice que la protección contra infecciones es específica (155?).

En 1722, el Príncipe y la princesa de Gales en Inglaterra permiten la variolización de su hijo favoreciéndose esta medida al resto de la población, Voltaire en su libro de cartas filosóficas describe la variolización aplicando polvo de las costras de las lesiones de viruela en la mucosa nasal que fue practicada por los chinos y turcos (1733).

El contenido de lesiones de viruela de personas enfermas, en personas sanas, las dejaba libres de contraer la enfermedad. El primer acercamiento a la inmunización con criterios racionales fue realizado por el médico inglés Edward Jenner (1749-1823), tras su constatación de que las vaqueras que habían adquirido la viruela vacunal (una forma benigna de enfermedad que sólo producía pústulas en las manos) no eran atacadas por la grave y deformante viruela humana. Esta observación llevó a Edward Jenner, médico inglés en 1796, a transferir seis semanas después pus de una lesión infectada de una ordeñadora (Sarah Nelmes) al brazo del niño James Phipps y éste no enfermó. Jenner publicó sus resultados en 1798 (*"An enquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae..."*), pronosticando que la aplicación de su método podría llegar a erradicar la viruela. Jenner fue el primero en recalcar la importancia de realizar estudios clínicos de seguimiento de los pacientes inmunizados, consciente de la necesidad de contar con controles fiables. La falta de conocimiento, en aquella Época, de las bases microbiológicas de las enfermedades infecciosas retrasó en casi un siglo la continuación de los estudios de Jenner, aunque ciertos autores, como Turenne, en su libro "La syphilization" (1878) lograron articular propuestas teóricas de cierto interés.

A fines del siglo XIX Robert Koch demostró que las enfermedades infecciosas eran provocadas por microorganismos, (virus, bacterias, hongos y parásitos), causantes de enfermedad ó patología. Transmite el ántrax a los animales a partir de un cultivo "*in vitro*", cumpliéndose los postulados de Koch. 1876. Hizo además aportes fundamentales sobre hipersensibilidad.

El primer abordaje plenamente científico de problemas inmunológicos se debió, a Louis Pasteur. Estudiando la bacteria responsable del cólera aviar (más tarde conocida como *Pasteurella aviseptica*), observó (1880) que la inoculación en gallinas de cultivos viejos, poco virulentos, las protegía de contraer la enfermedad cuando posteriormente eran inyectadas con cultivos normales virulentos. De esta forma se obtuvo la primera vacuna a base de microorganismos atenuados. Fue Pasteur quien dio carta de naturaleza al término vacuna, en honor del trabajo pionero de Jenner.

En los años siguientes Pasteur abordó la inmunización artificial para otras enfermedades; concretamente, estableció de forma clara que cultivos de *Bacillus anthracis* atenuados por incubación a 45°C conferían inmunidad a ovejas expuestas a contagio por carbunco. Años después, abordaría la inmunización contra la rabia, enfermedad de la que se desconocía el agente causal. Pasteur observó que éste perdía virulencia cuando se mantenían al aire durante cierto tiempo extractos medulares de animales infectados, por lo que dichos extractos se podían emplear eficazmente como vacunas. Realizó la primera vacunación antirrábica en humanos el 6 de julio de 1885, sobre el niño Joseph Meister, que había sido mordido gravemente por un perro rabioso. A este caso siguieron otros muchos, lo que valió a Pasteur reconocimiento universal y supuso el apoyo definitivo a su método de inmunización, que abría perspectivas prometedoras de profilaxis ante muchas enfermedades. Estos logros determinaron, en buena medida, la creación del Instituto Pasteur, que muy pronto reunió a un selecto grupo de científicos, que enfocarían sus esfuerzos en diversos aspectos de las inmunizaciones y de sus bases biológicas. A su vez, los norteamericanos Salmon y Smith (1886) perfeccionaron los métodos serológicos de Pasteur, lo que les permitió producir y conservar más fácilmente sueros tipificados contra la peste porcina.

A finales del siglo XIX existían dos teorías opuestas sobre los fundamentos biológicos de las respuestas inmunes. Por un lado, el zoólogo ruso Ilya Ilich Mechnikov (1845-1916), que había realizado observaciones sobre la fagocitosis en estrellas de mar y pulgas de agua, estableció, a partir de 1883, su "Teoría de los fagocitos", tras estudiar fenómenos de englobamiento de partículas extrañas por los leucocitos de conejo y de humanos. Informó que existían fenómenos de eliminación de agentes patógenos por medio de "células devoradoras" (fagocitos) que actuaban en animales vacunados contra el carbunco, y explicó la inmunización como una "habituaación" del hospedador a la fagocitosis. Más tarde, ya integrado en el Instituto Pasteur, propugnó la idea de que los fagocitos segregan enzimas específicos, análogos a los "fermentos" digestivos (1900). Esta teoría de los fagocitos constituyó el núcleo de la **teoría de la inmunidad celular**, de modo que la fagocitosis se consideraba como la base principal del sistema de defensa inmune del organismo.

Por otro lado, la escuela alemana de Koch hacía hincapié en la importancia de los mecanismos humorales (**teoría de la inmunidad humoral**). Emil von Behring (1854-1917)

y Shibasaburo Kitasato (1856-1931), a resultas de sus trabajos sobre las toxinas del tétanos y de la difteria, observaron que el cuerpo produce "antitoxinas" (más tarde conocidas como anticuerpos) que tendían a neutralizar las toxinas de forma específica, y evidenciaron que el suero que contiene antitoxinas es capaz de proteger a animales expuestos a una dosis letal de la toxina correspondiente (1890). La intervención de Ehrlich permitió obtener sueros de caballo con niveles de anticuerpos suficientemente altos como para conferir una protección eficaz, e igualmente se pudo disponer de un ensayo para cuantificar la "antitoxina" presente en suero. Ehrlich dirigió desde 1896 el Instituto Estatal para la Investigación y Comprobación de Sueros, en Steglitz, cerca de Berlín, y, a partir de 1899, estuvo al frente del mejor equipado Instituto de Terapia Experimental, en Frankfurt. Durante este último periodo de su vida, Ehrlich produce una impresionante obra científica, en la que va ahondando en la comprensión de la inmunidad humoral. En 1900 da a luz su "**Teoría de las cadenas laterales**", en la que formula una explicación de la formación y especificidad de los anticuerpos, estableciendo una base química para la interacción de éstos con los antígenos. Por su lado, R. Kraus visualiza por primera vez, en 1897, una reacción antígeno-anticuerpo, al observar el enturbiamiento de un filtrado bacteriano al mezclarlo con un suero inmune específico (antisuero). Durante cierto tiempo se creyó que el suero posee distintas actividades inmunes humorales, cada una denominada de forma diferente: antitoxina (neutralización de toxinas), precipitina (precipitación de toxinas), aglutinina (aglutinación de bacterias) y bacteriolisina (lisis de bacterias). Hubo que esperara a los años 30 para caer en la cuenta que todas estas actividades se debían a un único tipo de entidad, que fue bautizado como **anticuerpo**.

En 1898 Jules Bordet (1870-1961) descubre otro componente sérico relacionado con la respuesta inmunitaria, al que bautiza como "alexina", caracterizado, frente al anticuerpo, por su termolabilidad e inespecificidad (más tarde se impondría el nombre de **complemento**, propuesto por Ehrlich). El mismo Bordet desarrolló, en 1901, el primer sistema diagnóstico para la detección de anticuerpos, basado en la fijación del complemento, y que inició un largo camino, que llega a nuestros días.

La conciliación de las dos teorías (celular y humoral) se inició con los trabajos de Almoth Wrigth y Stewart R. Douglas, quienes en 1904 descubren las opsoninas, anticuerpos presentes en los sueros de animales inmunizados y que, tras unirse a la superficie bacteriana, incrementan la capacidad fagocítica de los leucocitos. En los años 50 se reconoce que los **linfocitos** son las células responsables de los dos componentes, humoral y celular, de la inmunidad.

El área de la **inmunopatología** inicia con la descripción del fenómeno de anafilaxia producido por introducción en un animal de un suero de una especie distinta (Portier y Richet, 1902; Arthus, 1903), lo que a su vez abriría la posibilidad de métodos de serodiagnóstico, con aplicaciones múltiples en Medicina, Zoología y otras ciencias biológicas. En 1905 Pirquet sugiere que la enfermedad del suero (un fenómeno de hipersensibilidad) tiene relación directa con la producción de anticuerpos contra el suero inyectado, introduciendo el término de **alergia** para referirse a la reactividad inmunológica alterada.

La **inmunoquímica** cobra un gran impulso en las primeras décadas del siglo XX con los trabajos de Karl Landsteiner (1868-1943). Su primera contribución de importancia había sido la descripción, mediante reacciones de aglutinación, del sistema de antígenos naturales (ABO) de los eritrocitos humanos (1901-1902), completada (en colaboración con Von Dungern y Hirzfeld), con las subdivisiones del grupo A y el estudio de su transmisión hereditaria. Estos trabajos sirvieron de estímulo para avanzar en el desentrañamiento de la especificidad química de los antígenos que determinan la formación de anticuerpos. Landsteiner estudió sistemáticamente las características de inmunogenicidad y especificidad de reacción de antígenos con anticuerpos, valiéndose de la modificación química de antígenos, denominando **haptenos** a aquellos grupos químicos que por sí mismos no desencadenan formación de anticuerpos, pero sí lo hacen tras ser conjugados a proteínas portadoras.

La cuestión de las reacciones antígeno-anticuerpo se convirtió en otra polémica entre escuelas hasta finales de los años 20. Mientras Ehrlich y sus seguidores mantenían que estas reacciones tienen una base puramente química, Bordet y sus discípulos las explicaban como fenómenos físicos de reacciones entre coloides. La resolución del debate debió aguardar hasta finales de los años 30, al incorporarse avances técnicos como la electroforesis, la cromatografía en papel, la ultracentrifugación y el microscopio electrónico. Heidelberg y Kendall (1936) purificaron anticuerpos a partir de sueros por disociación de precipitados. Tiselius (1939) demostró que los anticuerpos constituyen la fracción gamma-globulínica del suero. En 1959, Rodney R. Porter y Gerald M. Edelman presentan el modelo fundamental de las inmunoglobulinas (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) y su estructura química., acontecimiento que separó los 200 años de la historia de la inmunología en dos períodos, en los cuales más de 70 investigadores han hecho su contribución en los campos de: la inmunidad, la serología, la inmunoquímica y la inmunobiología.

Durante este lapso de tiempo se descubre que la síntesis de anticuerpos ocurre en las células plasmáticas, aunque éstas no son puestas en relación aún con los linfocitos; durante muchos años se siguió creyendo que los linfocitos eran células pasivas, sin función inmune. Por aquella época se describe, también, la diversidad de inmunoglobulinas, llegándose al establecimiento de una nomenclatura. Enseguida comienza la era de los múltiples experimentos sobre timectomía en ratones neonatos y sobre bursectomía en aves, así como los de reconstitución de animales irradiados, con timocitos y células de la médula ósea, y que permiten afirmar el papel esencial de los linfocitos, encuadrarlos en tipos funcionales T y B, y relacionarlos con las respuestas inmunes celular y humoral, respectivamente.

Una importante faceta de la inmunología de la primera mitad del siglo XX fue la obtención de **vacunas**. Se lograron toxoides inmunogénicos a partir de toxinas bacterianas, en muchos casos por tratamiento con formol: toxoide tetánico (Eisler y Lowenstein, 1915) y toxoide diftérico (Glenny, 1921). En 1922 se desarrolla la vacuna BCG contra la tuberculosis, haciendo uso de una cepa atenuada de *Mycobacterium tuberculosis*, el bacilo de Calmette-Guérin. La utilización de coadyuvantes se inicia en 1916, por LeMoignic y Piroy.

La **inmunogenética** nace cuando Bernstein describe en 1921 el modelo de transmisión hereditaria de los cuatro grupos sanguíneos principales, basándose en el análisis estadístico

de sus proporciones relativas, y con el descubrimiento por Landsteiner y Levène (1927) de los nuevos sistemas MN y P. Los experimentos de transfusiones sanguíneas interespecíficas permitieron distinguir la gran complejidad de los antígenos sanguíneos, explicables según unos 300 alelos múltiples.

Otra de las grandes controversias de los primeros tiempos de la Inmunología se refería al tipo de mecanismos postulados para explicar la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo. Se propusieron dos tipos de teorías: la **selectiva** y la **instructiva**. La primera formulación de tipo instructivo se debió a Paul Ehrlich (teoría de las cadenas laterales): suponía que las células inmunes expresan en su superficie una gran variedad de cadenas laterales preformadas; la unión de un agente patógeno determinado con una cadena lateral adecuada sería análoga a la complementariedad entre una llave y su cerradura; dicha interacción originaría la liberación de la cadena lateral, e induciría a la célula a producir y liberar más cadenas laterales de ese tipo concreto. Como se ve, esta teoría supone que la selectividad de la cadena lateral está determinada previamente a la exposición al antígeno, que sólo actúa seleccionando la producción y liberación de la cadena adecuada.

En cambio, durante los años 30 y 40 se daba más crédito a las teorías instructivas. En ellas, el antígeno juega un papel central a la hora de determinar la especificidad del anticuerpo correspondiente. Se sugería que el antígeno serviría como un molde alrededor del cual se plegaría la molécula del anticuerpo, que de esta forma adquiriría su especificidad. Estas teorías, popularizadas sobre todo por Linus Pauling, podían encajar en aquellos tiempos en que aún existían muchas lagunas de los conocimientos, pero en los años 50, tras los nuevos descubrimientos en Biología Molecular (ADN, ARN, código genético, etc.), fueron descartadas.

Una contribución esencial a las ideas sobre el mecanismo de formación de los anticuerpos la realizó el australiano Macfarlane Burnet (1899-1985), al establecer su **teoría de la selección clonal**; ésta argumenta que cada linfocito B, previamente al contacto con el antígeno, sintetiza un único tipo de anticuerpo, específico para cada antígeno determinante antigénico), de modo que la unión del antígeno causa la proliferación clonal del linfocito B, con la consecuente síntesis incrementada de anticuerpos específicos. Esta teoría resucitó las ideas selectivas, y actualmente es el paradigma aceptado por todos los inmunólogos. Más recientemente Niels Jerne ha realizado nuevas aportaciones y refinamientos a la teoría de la selección clonal, proponiendo un modelo de **regulación inmune** conocido como teoría de las **redes idiotópicas**.

Cabe citar la técnica de producción de anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas, desarrollada originalmente por Cesar Milstein y Georges Kohler en 1975, y que presenta una enorme gama de aplicaciones en biomedicina, o el desentrañamiento de los fenómenos de reorganización genética responsables de la expresión de los genes de inmunoglobulinas, por Susumu Tonegawa. Para 1983 James Allison y Kathryn Haskins aíslan el receptor para antígeno de los linfocitos T. En 1984 Mark Davis y Tak Mak caracterizan los genes del receptor para antígeno de linfocitos T.

Desde 1901 hasta nuestros días alrededor de 25 científicos han obtenido el premio Nóbel por distintos descubrimientos que han sido un aporte fundamental en Inmunología. En dos

siglos de historia se han realizado grandes avances científicos en áreas como: la serología, inmunidad celular, inmunología molecular e inmunogenética. Mecanismos inmunológicos han permitido explicar la patogénia de diversas enfermedades: alergias, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias y gamopatías monoclonales. Desarrollo de áreas como la inmunofarmacología, inmunología del cáncer y la inmunología del trasplante. En el ámbito del diagnóstico el uso de sondas y métodos inmunológicos contribuyen en áreas como la medicina humana, la veterinaria y la fisiopatología. El desarrollo de la inmunohistoquímica es un gran paso para la inmunología, estudiando directamente lo que sucede en la célula o en secciones de tejidos.

Anticuerpos

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible. Ellos son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. Los anticuerpos existen como una o mas unidades en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada Y contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, heavy chain), y dos copias idénticas entre sí de una cadena ligera (LC, light chain), llamadas así por sus pesos moleculares relativos que son de aproximadamente 50kDa la cadena pesada y de cerca de 25kDa la cadena ligera. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros intercatenarios. Estas cadenas pueden separarse por reducción de los enlaces S-S y acidificación (Figura 1).

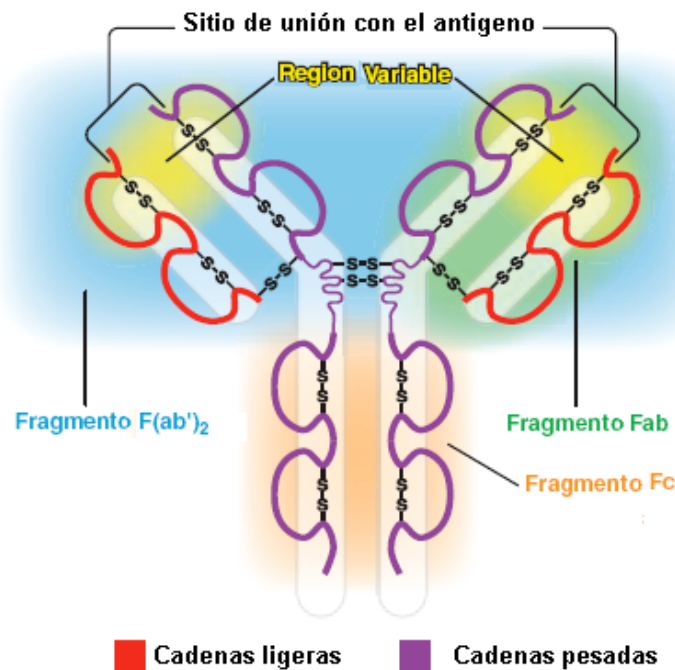


Figura 1. Estructura de un anticuerpo

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades Y y en el tipo de cadena pesada. Las cadenas pesadas de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, son conocidas como *gamma*, *mu*, *alpha*, *delta* y *epsilon* (γ , μ , α , δ y ϵ), respectivamente. Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo pueden ser clasificadas como tipo *kappa* (κ) o *lambda* (λ), basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas; sin embargo, las cadenas pesadas determinan la subclase de cada anticuerpo (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de inmunoglobulinas humanas

Inmunoglobulina	Cadena pesada	Cadena ligera	Coefficiente de Sedimentación	PM Wt (M _r)	M _r Cadena pesada	Contenido carbohidratos (%)	A _{280nm}	pl
IgG ₁	λ_1	κ , λ	7S	146 000	50 000	2-3	13.8	5.0-9.5
IgG ₂	λ_1	κ , λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-8.5
IgG ₃	λ_1	κ , λ	7S	170 000	60 000	2-3		8.2-9.0
IgG ₄	λ_1	κ , λ	7S	146 000	50 000	2-3		5.0-6.0
IgM	μ	κ , λ	19S	900 000	68 000	12	12.5	5.1-7.8
IgA ₁	α_1	κ , λ	7S	160 000	56 000	7-11	13.4	5.2-6.6
IgA ₂	α_2	κ , λ	7S	160 000	52 000	7-11		5.2-6.6
IgA ₃	α_1 , α_2	κ , λ	11S	370 000	52-56 000	11		4.7-6.2
IgD	δ	κ , λ	7S	184 000	68 000	12	17.0	-
IgE	ϵ	κ , λ	8S	190 000	72 000	12	15.3	-

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de inmunoglobulinas de ratón

Inmunoglobulina	Cadena pesada	Cadena ligera	Coefficiente de Sedimentación	PM Wt (M _r)	M _r Cadena pesada	Contenido carbohidratos (%)	A _{280nm}	pl
IgG ₁	λ_1	κ , λ	7S	150 000	50 000	2-3	7.0-8.5	
IgG _{2a}	λ_{2a}	κ , λ	7S	150 000	50 000	2-3	6.5-7.5	
IgG _{2b}	λ_{2b}	κ , λ	7S	150 000	50 000	2-3	5.5-7.0	
IgG ₃	λ_3	κ , λ	7S	150 000	50 000	2-3	-	
IgM	μ	κ , λ	19S	900 000	80 000	12	4.5-7.0	
IgA	α	κ , λ	7S	170 000	70 000	7-11	4.0-7.0	
IgD	δ	κ , λ	7S	180 000	68 000	12-14	-	
IgE	ϵ	κ , λ	8S	190 000	80 000	12	-	

Las subclases de anticuerpos difieren en el número de puentes disulfuro y la longitud de la región “bisagra”. El anticuerpo más comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos es el de la clase IgG debido a que son las inmunoglobulinas más abundantes en la circulación en el suero, la región bisagra expuesta tiene estructura extendida debido al alto contenido de prolina, por lo que es vulnerable al ataque proteolítico; en consecuencia, es muy fácil escindir la molécula en el laboratorio mediante papaína, para obtener dos fragmentos Fab (llamados así por el fragmento que contiene el sitio de unión al antígeno por sus siglas en ingles) idénticos, cada uno con un único sitio de combinación para el antígeno, y un tercer fragmento, Fc (fragmento que cristaliza), que carece de capacidad para fijar el antígeno.

La pepsina ataca en otro punto y escinde el Fc del resto de la molécula, para separar un fragmento 5S de gran tamaño que se designa F(ab')₂, dado que se mantiene divalente con respecto a la fijación al antígeno, al igual que el anticuerpo original (Figura 2). La región entre los fragmentos Fab y Fc es a la que se le llama bisagra. Este segmento le permite movimiento lateral y rotacional de los dos dominios que se unen al antígeno. Una cadena

ligera asociada con la región amino-terminal de una cadena pesada forman un dominio de unión al antígeno. Las regiones carboxi-terminal de las dos cadenas pesadas se doblan juntas para formar el dominio Fc.

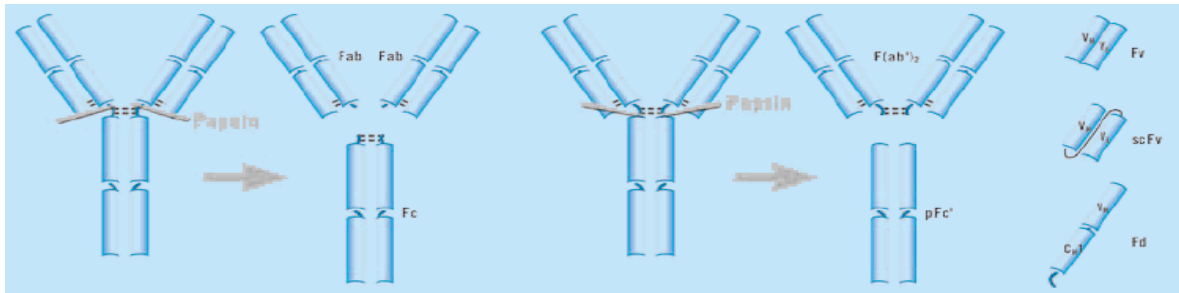


Figura 2. Fragmentos de anticuerpos creados por diferentes enzimas

La clásica forma Y de un IgG está compuesta de dos variables: brazos antígeno específico F(ab), los cuales son críticos para la unión del antígeno, y la “cola” constante Fc que sirve como “mango” para la manipulación del anticuerpo durante muchos procedimientos inmunológicos. El número de regiones Fab en un anticuerpo, corresponde con su subclase, y determina la **valencia** del anticuerpo (el número de brazos con el que el anticuerpo puede unirse al antígeno, Figura 3).

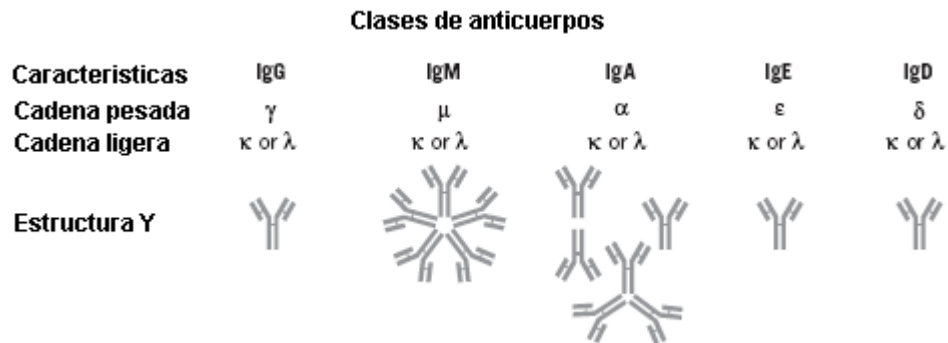


Figura 3. Diferentes clases de anticuerpos

Anticuerpos directamente conjugados pueden ser marcados con una enzima o un fluoróforo en la región Fc. La región Fc también ancla el anticuerpo a platos en ensayos de ELISA y además por anticuerpos secundarios en ensayos de inmunoprecipitación, inmunoblots e inmunohistoquímica.

Antígenos

El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo.

La definición clásica de **antígeno** es cualquier sustancia foránea que elicitaba una respuesta inmune cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos. Polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden también funcionar como antígenos. La respuesta inmune puede también ser generada contra sustancias pequeñas, llamadas **haptenos**, si estos están acoplados a una proteína acarreadora, como la albúmina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas. Una variedad de moléculas como drogas, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos pueden funcionar como haptenos. Así, dándole suficiente tiempo, cualquier sustancia foránea será identificada por el sistema inmune y evocará la producción de un anticuerpo específico. Sin embargo, esta respuesta inmune específica es altamente variable y depende mucho en parte del tamaño, estructura y composición de los antígenos. Los antígenos que elicitaban una fuerte respuesta inmune se dice que son altamente **inmunogénicos**.

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan **parátomos** y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado **epítotope**. Un epítotope no tiene una propiedad intrínseca de alguna estructura particular. Estos son usualmente uno a seis monosacáridos o 5-8 residuos de aminoácidos sobre la superficie del antígeno.

Debido a que la molécula de antígeno existe en el espacio, el epítotope reconocido por un anticuerpo puede depender de la presencia de una específica conformación tridimensional del antígeno (por ejemplo, un sitio único formado por la interacción de dos loops o subunidades de una proteína nativa) o el epítotope puede corresponder a una región de una secuencia primaria simple, así, los epítotoses son descritos como conformacionales y lineares, respectivamente. El rango de posibles sitios de unión es enorme, ya que cada sitio de unión tiene sus propias propiedades estructurales derivadas de enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas.

Para que exista una eficiente interacción entre el antígeno y el anticuerpo, el epítotope debe estar fácilmente disponible para la unión. Si la molécula blanco es desnaturalizada, por ejemplo, por la fijación, cambios de pH o durante la preparación para el gel de electroforesis, el epítotope puede ser alterado y esto puede afectar su habilidad para interactuar con un anticuerpo. Por ejemplo, algunos anticuerpos son inefectivos en un Western blot pero muy buenos en inmunohistoquímica debido a que en el proceso, un complejo sitio antigénico puede ser mantenido en el tejido, mientras que en el otro procedimiento la preparación de la muestra altera la conformación de la proteína lo suficiente para destruir el sitio antigénico y así elimina el sitio de unión con el anticuerpo.

Si el producto de un gene de interés esta presente en concentraciones extremadamente bajas, una opción puede ser el uso de la información de la secuencia conocida de nucleótidos para derivar el correspondiente péptido para generar anticuerpos específicos para esa secuencia.

Características de un buen antígeno incluyen:

- Areas de estabilidad estructural dentro de la molécula
- Un peso molecular mínimo de 8000 a 10000 Daltons, aunque los haptenos con pesos moleculares tan bajos como 200 Da han sido usados en presencia de proteínas acarreadoras
- La habilidad de ser procesado por el sistema inmune
- Regiones inmunogénicas accesibles al mecanismo formado por el anticuerpo
- Elementos estructurales que sean suficientemente diferentes al huésped
- Para péptidos antígenos, regiones que contengan por lo menos 30% de aminoácidos inmunogénicos: K, R, E, D, Q, N
- Para péptidos antígenos, significativa hidrofobicidad o residuos cargados

Interacción antígeno-anticuerpo

Los antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes. La asociación específica del antígeno y el anticuerpo es dependiente de los puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de van der Waals; por lo general solo son efectivas en distancias cortas. Todos estos son uniones débiles no covalentes, aunque algunas de las asociaciones entre antígeno y anticuerpo pueden ser bastante fuertes. Al igual que los anticuerpos, los antígenos pueden ser multivalentes, ambos a través de múltiples copias del mismo epítipo, o a través de la presencia de múltiples epítopes que son reconocidos por múltiples anticuerpos. Las interacciones que involucran multivalencias pueden producir mayor estabilidad a los complejos, sin embargo la multivalencia puede también resultar en dificultades estéricas, por lo tanto reduciendo la posibilidad de unión.

Los haptenos de tamaño pequeño en sí son monovalentes en lo que respecta a la reacción con el anticuerpo. En un experimento donde se mezcló el hapteno con el anticuerpo en una bolsa de diálisis se mostró que la combinación con el anticuerpo era reversible y que el complejo así formado podría disociarse con facilidad en función de la fuerza de unión, a la que denominamos afinidad. En la situación simplista de un brazo de unión Fab aislado a un epítipo en el antígeno, la fuerza de unión puede definirse mediante la constante de equilibrio K_A de la reacción de asociación:



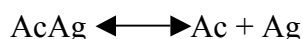
Como todas las uniones antígeno-anticuerpo son reversibles y siguen los principios básicos termodinámicos de cualquier interacción reversible bimolecular, tenemos que:

$$K_A = \frac{[Ac-Ag]}{[Ac][Ag]}$$

$$\frac{[Ac][Ag]}{[AcAg]}$$

donde K_A es la **constante de afinidad**, Ac y Ag son las concentraciones molares de los sitios de unión no ocupados del anticuerpo y del antígeno, respectivamente, y Ac-Ag es la concentración molar del complejo antígeno-anticuerpo. Si el anticuerpo y el antígeno encajaban juntos de modo muy íntimo, el equilibrio estaría bien a la derecha de la reacción de asociación; nos referimos a estos anticuerpos que se unen con fuerza al antígeno como anticuerpos de alta afinidad.

Así mismo la afinidad puede definirse en términos de la constante de disociación (K_D) de la reacción:



Si las concentraciones se expresan en moles por litro:

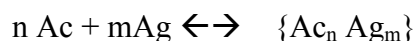
$$K_D = \frac{[\text{moles de Ac/L}][\text{moles de Ag/L}]}{[\text{moles de AcAg/L}]}$$

Es claro que K_D es la reciproca de K_A , es decir, $1/K_A$ y sus unidades son moles/L o M. Al contrario, K_A se expresa en las unidades L/mol o M^{-1} y tiene la ventaja de que cuanto mayor es la fuerza de unión la cifra es mas alta.

El tiempo que toma en alcanzar el equilibrio es dependiente de la velocidad de difusión y de la afinidad del anticuerpo sobre el antígeno y puede variar ampliamente. Las constantes de afinidad de unión antígeno-anticuerpo pueden abarcar un amplio rango, extendiéndose por debajo de 10^5 mol^{-1} hasta más de 10^{12} mol^{-1} . Las constantes de afinidad pueden ser afectadas por la temperatura, el pH y los solventes.

La afinidad describe la fuerza de interacción entre anticuerpo y antígeno en un solo sitio antigénico. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo interactúa a través de fuerzas débiles no covalentes con el antígeno en numerosos sitios. Mientras que el término afinidad describe la unión del anticuerpo a un hapteno monovalente o a un solo determinante antigénico, en la mayoría de las circunstancias practicas nos preocupamos por la interacción con el antisuero (es decir, el suero proveniente de un individuo inmunizado) con un antígeno multivalente. El termino empleado para expresar esta unión es la **avidez** o afinidad funcional. La avidez es la fuerza con la que el Ac multivalente se une a un Ag multivalente. Aunque depende de las afinidades individuales de cada uno de los determinantes individuales de ese antígeno, su valor es mucho mayor que la suma de afinidades.

Pero por otro lado, hay que considerar que los Ag naturales suelen tener más de un tipo de determinante antigénico. Cuando un antígeno de este tipo entra en un individuo, éste produce un antisuero, que presenta varios tipos de anticuerpos, cada uno de ellos dirigidos a un tipo diferente de determinante antigénico del Ag original. En este caso se habla de **avidez del antisuero**, que es la fuerza conjunta de los distintos anticuerpos de ese antisuero que reconocen al antígeno multivalente complejo:



donde n representa la heterogeneidad del anticuerpo, y m los distintos tipos de epítopos del antígeno.

Los factores que contribuyen a la avidez del antisuero son complejos, pero uno muy interesante es el derivado de la **multivalencia del antígeno**. La fuerza de unión de un antígeno complejo multivalente a varios tipos de Ac es mucho mayor que la suma aritmética de las fuerzas de unión de cada anticuerpo: La avidez refleja mejor la situación fisiológica, pero la afinidad nos caracteriza lo que ocurre con cada tipo de anticuerpo concreto en su interacción con el epítipo.

La avidez es quizá una medida más informativa de toda la estabilidad o la fuerza del complejo antígeno-anticuerpo. Esto es controlado por tres factores: la afinidad anticuerpo-epítipo; las valencias de ambos, antígeno y anticuerpo; y el arreglo estructural de las partes que interactúan. Cuando el anticuerpo y el antígeno pueden formar complejos multivalentes, la fuerza de interacción es grandemente incrementada. Estos factores definen la **especificidad** del anticuerpo, que es, la probabilidad de que un anticuerpo particular se una a un preciso epítipo del antígeno. Dado que la intensidad de la reacción puede cuantificarse por la afinidad o la avidez, relacionaríamos la especificidad de un antisuero con su avidez relativa por los antígenos para los que están siendo discriminados.

Al reconocer que un antisuero puede tener una avidez relativamente mayor por un antígeno que por otro, indicamos que el antisuero despliega una especificidad relativa más que absoluta; en la práctica se habla de grados de reactividad cruzada. La **reactividad cruzada** se refiere a un anticuerpo o población de anticuerpos unidos a epítopos sobre otros antígenos. Esto puede ser causado por ambos, por la baja avidez o especificidad del anticuerpo o por múltiples distintos antígenos que tienen idénticos o muy similares epítopos. La reactividad cruzada es a veces deseable cuando uno quiere una unión general a un grupo relacionado de antígenos o cuando se intenta clasificar especies cruzadas cuando la secuencia del epítipo del antígeno no está muy altamente conservada en la evolución.

Los aminoácidos que forman el sitio de unión del antígeno son derivados de ambas cadenas, la pesada y la ligera, y corresponden a los aminoácidos de las regiones hipervariables determinadas por la secuencia de la proteína. Las regiones hipervariables son conocidas como las regiones determinantes de la complementariedad o CDRs (por sus siglas en inglés, *complementarity determining regions*). Los CDRs son seis, tres de cada cadena, y estos forman loops discretos anclados y orientados por las estructuras de los residuos de los dominios variables (Figura 4).

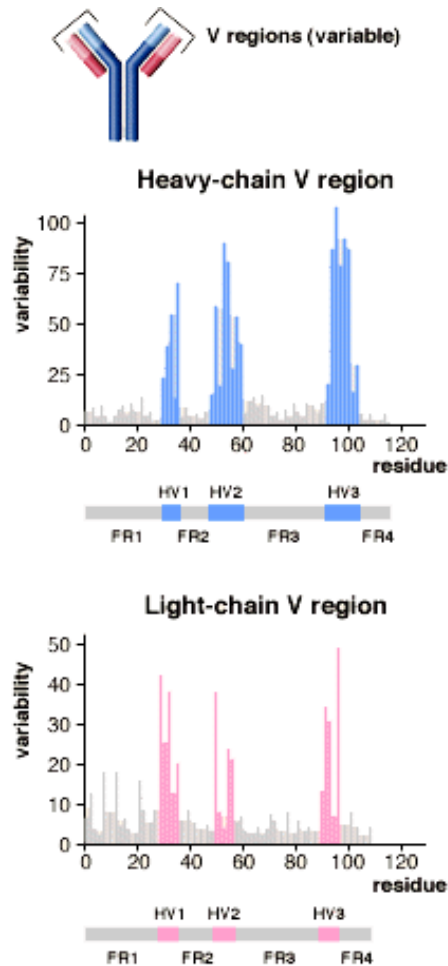


Figura 4. CDRs de las regiones variables (HV = regiones hipervariables)

Anticuerpos monoclonales y policlonales

Cuando se diseña un procedimiento experimental, es importante diferenciar entre anticuerpos monoclonales y policlonales, ya que estas diferencias son el fundamento de las ventajas y limitaciones en su uso.

Muchos de los anticuerpos usados en técnicas inmunoquímicas son producidos por inmunización repetida de un adecuado animal, por ejemplo, conejo, cabra u oveja, con una suspensión del antígeno apropiado. El suero es tomado en el pico de producción del anticuerpo. Concentraciones específicas de IgG de aproximadamente 1 a 10mg/mL de suero pueden ser obtenidas con este método. Moléculas débilmente antigénicas pueden requerir la adición de un adyuvante, el cual permite una salida mas lenta del antígeno haciendo que sea mas rápidamente atrapado por los macrófagos. Moléculas pequeñas como drogas pueden ser acopladas a estructuras más antigénicas (proteínas acarreadoras) para estimular la respuesta inmune.

Una característica de grandes moléculas antigénicas es que ellas inducen la activación de muchas células B productoras de anticuerpos en el animal inmunizado. Esta mezcla de

anticuerpos **policlonales** resultantes puede entonces reconocer una variedad de epítopes sobre el antígeno, el cual puede ser una característica de uso especial en algunos procedimientos experimentales (Figura 5). Debido a que esta mezcla de anticuerpos policlonales reacciona con múltiples epítopes sobre la superficie del antígeno, ellos pueden ser más tolerantes de cambios menores en el antígeno, por ejemplo, polimorfismo, heterogeneidad de glicosilación o ligera desnaturalización, que los anticuerpos monoclonales (homogéneos).

Dependiendo del antígeno que se haya usado para crear el anticuerpo, uno puede usar anticuerpos policlonales para identificar proteínas de alta homología con la proteína inmunogénica o para escoger de la proteína blanco en muestras de tejido de otras especies que el inmunógeno. A lo largo de la misma línea, esto es especialmente importante cuando se trabaja con anticuerpos policlonales instruirse acerca del inmunógeno que ha sido usado para la producción del anticuerpo policlonal y el potencial para indeseables reacciones cruzadas dentro de la misma muestra. Péptidos inmunogénicos son frecuentemente usados para generar anticuerpos policlonales que centran un único epítipo, especialmente para familias de proteínas de alta homología.

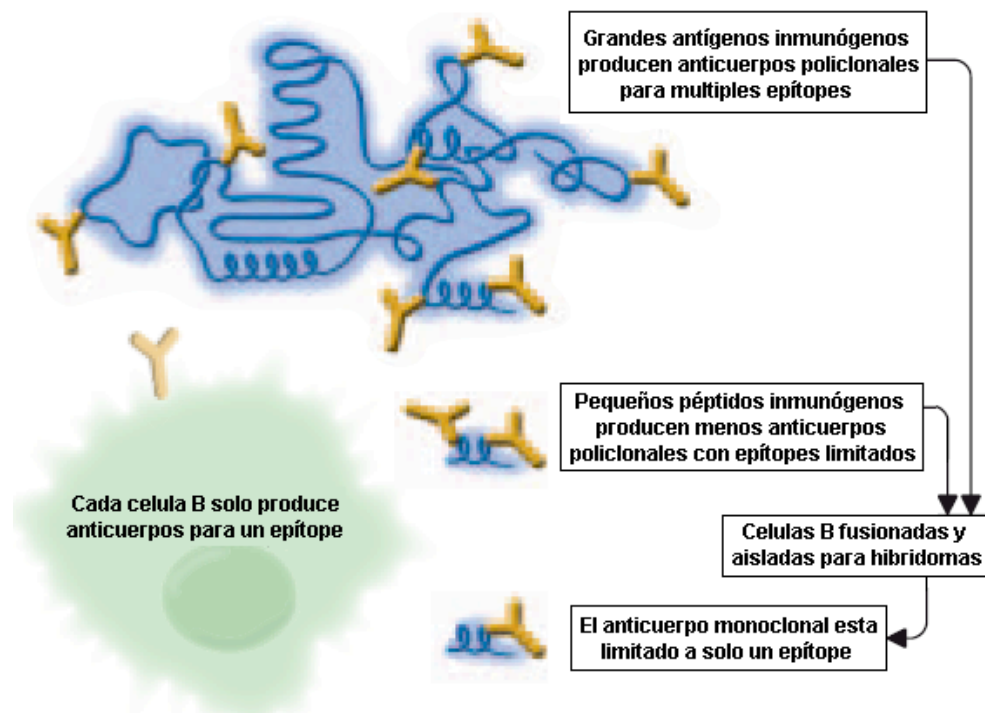


Figura 5. Anticuerpos policlonales y monoclonales

Una población homogénea de anticuerpos (anticuerpos **monoclonales**) puede ser promovida por fusión de linfocitos B con cultivos de células inmortalas para producir hibridomas. Los hibridomas producen muchas copias del mismo anticuerpo exacto. Este fenómeno impresionante ha sido fundamental en el desarrollo de anticuerpos con aplicaciones de diagnostico. Debido a que los anticuerpos monoclonales reaccionan con un epítipo del antígeno, estos son más vulnerables a la pérdida del epítipo a través de

tratamientos químicos del antígeno que los anticuerpos policlonales. Esto puede ser compensado por el uso de dos o más anticuerpos monoclonales del mismo antígeno.

Algunos usos de las propiedades de anticuerpos policlonales son:

- Los anticuerpos policlonales frecuentemente reconocen múltiples epítopes haciéndolos más tolerantes a pequeños cambios en la naturaleza del antígeno. Son frecuentemente la opción preferida para la detección de proteínas desnaturalizadas.
- Pueden ser generados en una variedad de especies, incluyendo conejos, cabras, ovejas, asnos, gallinas y otros, dándole al usuario muchas opciones en el diseño experimental.
- Los anticuerpos policlonales son a veces usados cuando la naturaleza del antígeno en una especie no estudiada no se conoce.
- Los anticuerpos policlonales se unen a múltiples epítopes y así ellos generalmente proveen una detección más robusta.

Algunos usos y propiedades de anticuerpos monoclonales son:

- Debido a su especificidad, los anticuerpos monoclonales son excelentes como anticuerpos primarios en un ensayo, o para detectar antígenos en un tejido y frecuentemente dan significativamente menos tinción de fondo que los anticuerpos policlonales.
- Cuando se compara con los anticuerpos policlonales, la homogeneidad de los anticuerpos monoclonales es muy alta. Si las condiciones experimentales se mantienen constantes, los resultados provenientes de anticuerpos monoclonales son altamente reproducibles entre experimentos.
- La especificidad de los anticuerpos monoclonales los hacen extremadamente eficientes para la unión al antígeno dentro de una mezcla de moléculas relacionadas, como para el caso de la purificación por afinidad.

Técnicas inmunoquímicas

Gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos de medida. La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en biología animal y vegetal difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos habituales.

Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac. La propiedad que tienen las Igs de unirse a un Ag, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visualizable por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcage con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente.

Dado que los antígenos y anticuerpos se definen por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Si disponemos de una solución de un anticuerpo

monoclonal, podemos definir su afinidad y especificidad con considerable confiabilidad y, si está en estado puro y en su conformación nativa, conoceremos que la concentración de anticuerpos es la misma que la de la inmunoglobulina, en mg/mL u otra unidad. Cuando se determina el contenido de anticuerpos en un antisuero, el problema es diferente debido a que la fracción inmunoglobulina esta compuesta de una serie enorme de moléculas en cantidades y afinidades variables.

Los sueros pueden compararse de acuerdo con su contenido de anticuerpos, ya sea por la determinación de cuantos anticuerpos se unen al antígeno en una dilución fija del suero o por la comprobación de una dilución seriada del suero para comprobar a que nivel una cantidad estándar de antígeno es suficiente para dar un resultado positivo de la unión. Éste es denominado **título de anticuerpos**. Para tomar un ejemplo, un suero podría diluirse, digamos, 10,000 veces y aun dar una prueba de aglutinación positiva. Este titulo de 1:10,000 permite realizar una comparación con otro suero mucho “más débil” que solo posea un titulo, digamos 1:100. Nótese que el título de un suero dado variará de acuerdo con la sensibilidad de la prueba, ya que se necesitan cantidades mucho más pequeñas de anticuerpos para unirse al antígeno cuando la prueba posee una alta sensibilidad, como la aglutinación, que en el caso de una prueba de baja sensibilidad, como la precipitación, la cual requiere concentraciones altas del producto antígeno-anticuerpo.

Existen diversos métodos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac (Tabla 3).

Tabla 3. Principales métodos analíticos basados en la unión Ag-Ac

Trazador	Denominación
Complejo Ag-Ac	Técnicas de inmunoprecipitación (técnica de Ouchterlony, Inmunoelectroforesis, difusión radial Mancini, nefelometría, etc.)
Aglutinado	Técnicas de inmunoaglutinación. (Hemaglutinación directa e indirecta y otras técnicas con látex, etc.)
Fluorocromo	Técnicas inmunofluorimétricas
Radioisótopos	Técnicas inmunorradiológicas (Radioinmunoensayo -RIA-)
Enzimas	Técnicas inmunoenzimáticas

Así tenemos:

1. Técnicas de aglutinación. Cuando el antígenos e encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción Ag-Ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano formado.
2. Técnicas de fluorescencia y citometría de flujo. Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.
3. Técnicas de radioinmunoensayo. En estas técnicas al anticuerpo se une un isótopo radiactivo siendo posible la cuantificación del complejo Ag-Ac a través de la radiactividad emitida.
4. Cromatografía de afinidad. La especificidad de la unión Ag-Ac puede utilizarse para obtener Acs y Ags puros.

5. Inmunoprecipitación e inmunoblotting. Permite detectar la presencia y cantidad de antígenos y anticuerpos específicos.

Técnicas de precipitación

Reacción de precipitación clásica

Cuando un antígeno en solución se agrega de manera progresiva a un antisuero potente, se forman precipitados del complejo antígeno-anticuerpo (Figura 6a y b). El entrecruzamiento de antígenos y anticuerpos da origen a estructuras enrejadas tridimensionales, las que coalescen, en gran parte a través de la interacción Fc-Fc, para formar grandes agregados que precipitan. A medida que se agregan más y más antígeno se alcanza un óptimo (Figura 6b) después del cual, de modo uniforme, se forma menos precipitado. En esta etapa puede demostrarse que el sobrenadante contiene complejos solubles de antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac), gran parte con composición Ag_4Ac_3 , Ag_3Ac_2 y Ag_2Ac (Figura 6c). En el extremo de exceso de antígeno (Figura 6c) el análisis por ultracentrifugación revela que los complejos son sobre todo de la forma Ag_2Ac , un resultado directamente atribuible a los dos sitios de combinación (bivalencia) de la molécula del anticuerpo IgG.

Los sueros contienen con frecuencia hasta el 10% de anticuerpos no precipitantes, los que son efectivamente monovalentes debido a la presencia asimétrica de oligosacáridos en uno de los brazos de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo, que bloquea de modo estereoquímico el sitio de combinación. Asimismo, los precipitados francos solo se observan cuando los antígenos, y en particular los anticuerpos, están presentes en concentraciones bastante grandes. Por lo tanto, cuando se forman los complejos que no precipitan de manera espontánea, deben aplicarse métodos más sofisticados para estimar el nivel de anticuerpos.

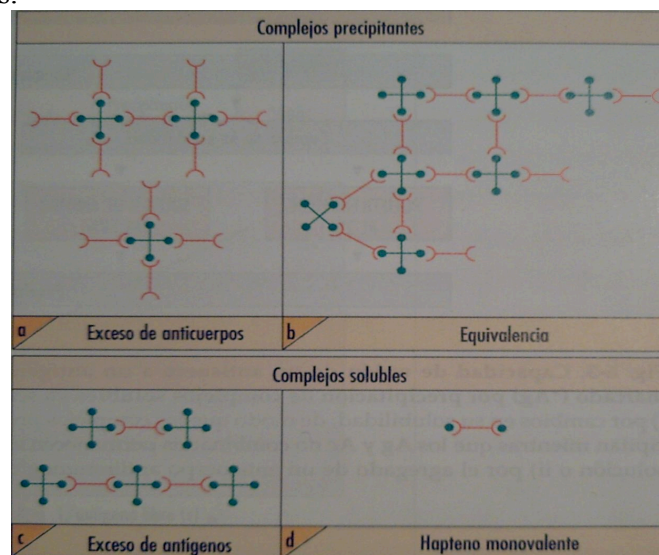


Figura 6. Representación esquemática de complejos formados entre un antígeno hipotético tetravalente y un anticuerpo bivalente mezclados en diferentes proporciones. Los anticuerpos no precipitantes pueden detectarse por nefelometría. Los pequeños agregados formados cuando se mezclan soluciones diluidas de antígeno y anticuerpo crean

una nubosidad o turbidez, que puede determinarse por dispersión angular anterior de una fuente de luz incidente (nefelometría). La mayor sensibilidad puede obtenerse mediante el uso de una luz monocromática proveniente de un láser y con el agregado de polietilenglicol a la solución, de modo tal que aumenta el tamaño del agregado. En la práctica, la nefelometría se aplica más a la detección de antígenos que a la de anticuerpos.

Para la realización de estas técnicas se requiere que tanto el Ac como el Ag se encuentren en un medio fluido en el que sea posible la precipitación del complejo Ag-Ac.

Existen diferentes modalidades siendo las principales:

1. Técnica de precipitación propiamente dicha.
2. Técnica de difusión radial de Ouchterlony.
3. Técnica de inmunoelectroforesis.
4. Técnica de difusión radial simple de Mancini.

1. Técnica de precipitación

El complejo Ag-Ac precipita espontáneamente o por centrifugación cuando la proporción de Ags y Acs de la mezcla es equivalente. En la Figura 7 se muestra un esquema de los tipos de complejos formados al mezclar, en tubos de ensayo, soluciones con diferentes cantidades de antígenos a los que se añaden igual cantidad de un antisuero.

La precipitación es máxima allí donde la proporción entre ambos es óptima (parte central de la curva), pero va disminuyendo a medida que predomine el Ac o el Ag (izquierda y derecha de la curva respectivamente) Este tipo de reacción no es muy utilizado al requerirse grandes concentraciones de antígeno y de anticuerpo para poder medir el precipitado formado.

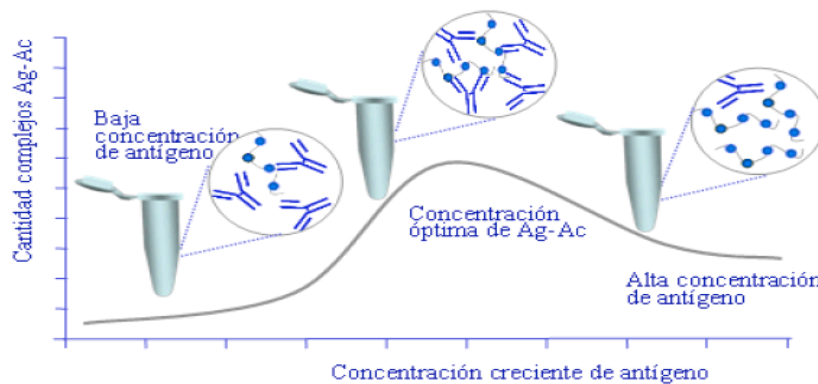


Figura 7. Curva de precipitación obtenida mezclando concentraciones de antígeno con una cantidad constante de anticuerpo.

2. Técnica de difusión radial doble de Ouchterlony

Esta técnica se realiza en placas de agar en donde se practican pocillos (Figura 8), en uno de estos pozos se coloca el suero o muestras a investigar y en el resto se coloca el anticuerpo preparado frente a la sustancia que se quiere identificar.

Cuando difunden, ambos sistemas se encontrarán y se formará en la zona de equivalencia el complejo Ag-Ac correspondiente que se hace visible en forma de una línea de precipitación. En una preparación que contenga varios antígenos, se obtendrán múltiples líneas de precipitado. La técnica de Ouchterlony permite identificar sustancias según la forma de unirse las líneas de precipitación de dos o varios sistemas.

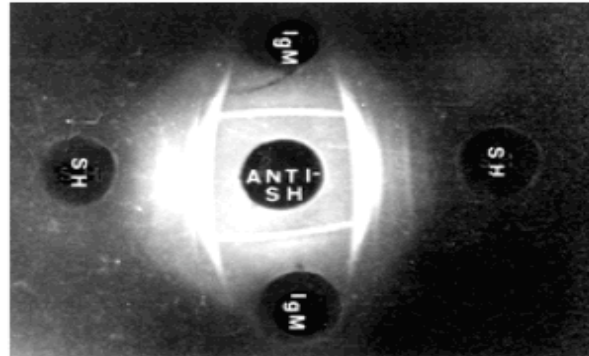


Figura 8. Placa de doble difusión de Ouchterlony en agar preparada

3. Técnica de inmunoelectroforesis

La inmunoelectroforesis es una técnica que se realiza en dos fases. Primero se separa la mezcla de Ags por electroforesis y posteriormente el antígeno que se desea detectar se hace reaccionar con un anticuerpo específico colocado en un pocillo lateral. Por difusión llegan a encontrarse los antígenos y el antisuero, apareciendo el complejo Ag-Ac visible en forma de líneas de precipitación que pueden ser estudiadas por comparación con un sistema estándar (Figura 9). En Inmunología clínica, esta técnica puede utilizarse en la identificación de las proteínas de mieloma.

Incremento de precipitación por inmunoelectroforesis con contracorriente

Esta técnica puede aplicarse a antígenos que migran hacia el polo positivo en la electroforesis en agar (si es necesario, los antígenos pueden sustituirse por grupos con carga negativa para lograr este fin). El antígeno y el antisuero se colocan en orificios realizados en el agar y se les aplica una corriente eléctrica (Figura 10). El antígeno migra de manera progresiva a la zona del anticuerpo donde sucesivamente se une más y más a las moléculas del anticuerpo, en esencia con un aumento artificial de la concentración efectiva de anticuerpo y, en consecuencia, forma una línea de precipitina.

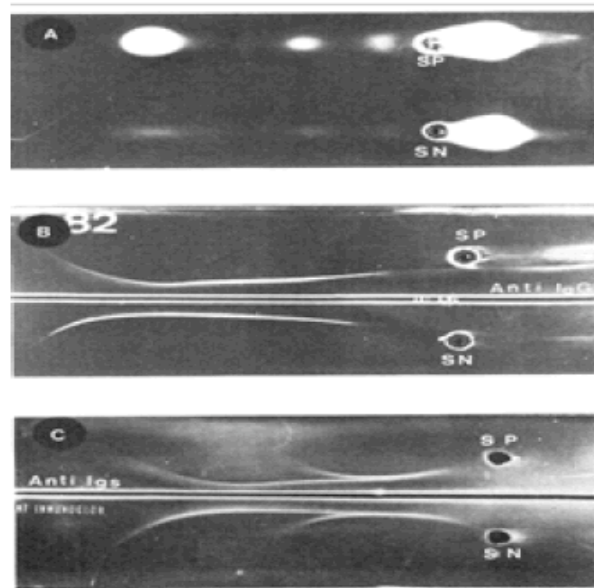


Figura 9. Inmunoelectroforesis de suero humano normal frente a anti IgG (B) y antiinmunoglobulinas (C)

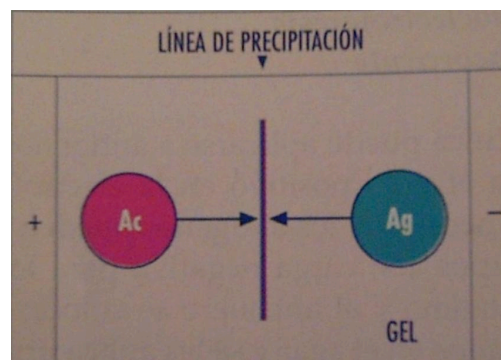


Figura 10. Inmunoelectroforesis con contracorriente

4. Técnica de difusión radial simple de Mancini

Esta técnica se basa en la difusión cuando un antígeno difunde desde un orificio al agar que lleva incorporado un anticuerpo específico, en un comienzo esta presente en una concentración relativamente alta y forma complejos solubles; al difundir el antígeno se genera un gradiente de concentración, a medida que el antígeno difunde más, la concentración disminuye de modo continuo hasta que se alcanza el punto en el cual los reactantes están más cerca de las proporciones óptimas (zona de equivalencia), el inmunocomplejo se insolubiliza y se forma un anillo de precipitación.

Este anillo de precipitación es fácilmente visible y las concentraciones antigénicas están en relación directa con el área del círculo de precipitación (Figura 11), cuanto más alta es la concentración del antígeno, mayor es el diámetro del anillo.

A esta técnica también se le conoce como cuantificación por inmunodifusión radial simple (**SRID**). Si se incorporan, digamos, tres estándares de concentración de antígeno en la placa, puede obtenerse una curva de calibración que sirve para determinar la cantidad de antígeno en las pruebas de muestras desconocidas. Este método fue utilizado de manera sistemática en inmunología clínica, en particular para las determinaciones de inmunoglobulina y también para sustancias como el tercer componente del complemento, transferina, proteína C reactiva y la proteína embrionaria, α -fetoproteína, que se asocia con ciertos tumores hepáticos. Cuando se desea analizar una mayor cantidad de muestras se tiende a usar la nefelometría.

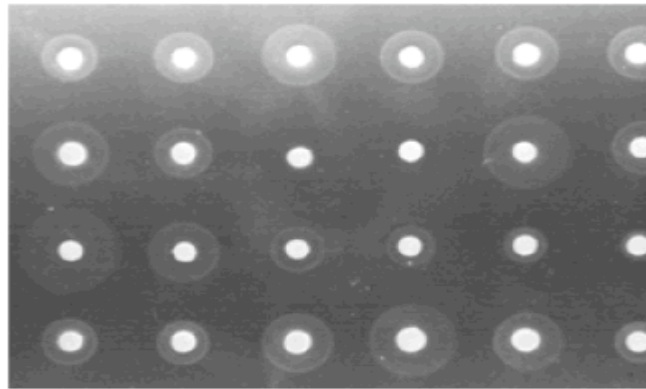


Figura 11. Placa de difusión radial de Mancini.

Técnicas de aglutinación

En estas técnicas se hacen visibles los complejos Ag-Ac por la aglutinación que producen los anticuerpos cuando el Ag forma parte o se ha unido artificialmente a la superficie de glóbulos rojos, plaquetas, leucocitos, partículas de látex, etc. Normalmente se utilizan glóbulos rojos (hemoaglutinación) o partículas de látex.

Agglutinación de partículas recubiertas por antígeno

Mientras que el entrecruzamiento de los antígenos proteicos multivalentes con el anticuerpo produce una precipitación, la interrelación entre células o partículas de gran tamaño con los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie conducen a una aglutinación. Dado que la mayoría de las células poseen cargas eléctricas, se requiere una cantidad razonable de anticuerpos entre dos células antes de que se supere la repulsión mutua. Por esto, puede ser difícil lograr la aglutinación de células que sólo poseen un número pequeño de determinantes, a menos que se utilicen métodos especiales, como el tratamiento adicional

con un reactivo antiglobulina. De manera similar, la mayor avidez del anticuerpo multivalente IgM con respecto a la IgG hace que el primero sea más eficaz como agente aglutinante, molécula por molécula (Figura 12).

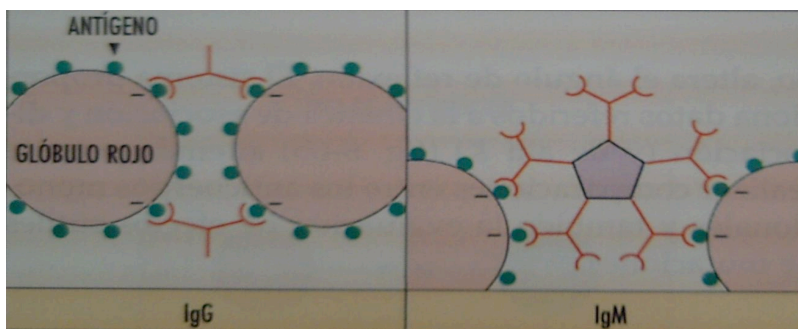


Figura 12. Mecanismo de aglutinación de partículas recubiertas por antígeno

Las reacciones de aglutinación se utilizan para identificar bacterias y para tipificar los glóbulos rojos; estas reacciones fueron observadas con leucocitos y plaquetas, e incluso con espermatozoides en cientos de casos de infertilidad masculina debida a aglutininas presentes en el espermatozoide. Debido a su sensibilidad y conveniencia, el uso de la prueba se ha extendido a la identificación de anticuerpos contra antígenos solubles que de modo artificial se adhieren sobre eritrocitos, las partículas de látex o de gelatina. La aglutinación de las partículas de látex recubiertas por IgG se utiliza para detectar los factores reumatoideos. Pruebas similares que utilizan partículas recubiertas con antígeno pueden llevarse a cabo en placas de microtitulación con fondo en U, donde puede observarse el patrón de sedimentación en el fondo de las cubetas; esto proporciona un indicador más sensible que la aglutinación macroscópica. La cuantificación de grados más sutiles de aglutinación puede lograrse por nefelometría o por un contador Coulter.

Hemoaglutinación directa

La presencia de antígenos en la superficie de los glóbulos rojos se puede detectar por la hemoaglutinación producida cuando se añade un antisuero con anticuerpos frente a dichos antígenos.

Esta técnica se emplea habitualmente para la identificación de los grupos sanguíneos y Rh, para lo cual a la sangre heparinizada se le añaden los antisueros correspondientes: anti-A, anti-B o anti-AB (todos ellos anti-Rh negativos). Habrá aglutinación cuando los glóbulos rojos posean la especificidad del antisuero añadido (Tabla 4). De igual manera se procede con antisueros anti-Rh para la determinación de los distintos grupos Rh.

Tabla 4. Determinación del grupo sanguíneo

Grupo sanguíneo	Agglutination with serum		
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB
O	-	-	-
A	+	-	+
B	-	+	+
AB	+	+	+

Hemoaglutinación indirecta

Se basa en el principio de la inhibición de la hemoaglutinación. Para su realización se precisan glóbulos rojos a los cuales se les ha unido la misma sustancia que se desea detectar o cuantificar (Figura 13). Si estos glóbulos rojos son puestos en presencia de anticuerpos preparados frente a dicha sustancia se producirá su aglutinación. Por el contrario, cuando se añade un suero problema que contiene la sustancia a cuantificar entonces los anticuerpos se unirán a dicha sustancia y no a los glóbulos rojos. En este caso no se producirá la hemoaglutinación. Por tanto, aglutinación (+) indica ausencia de la sustancia a estudiar, y aglutinación (-) indica presencia de la misma. La medida de gonadotrofina coriónica (HCG) para el diagnóstico de embarazo puede realizarse por esta técnica.

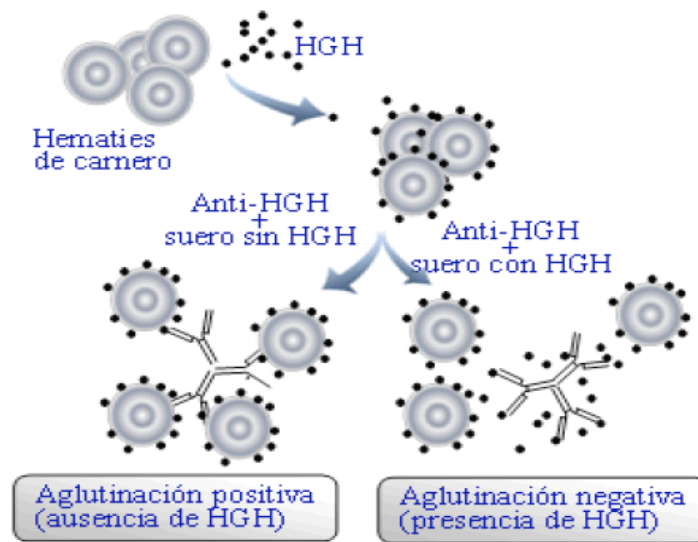


Figura 13. Inhibición por aglutinación de glóbulos rojos con gonadotrofina coriónica (HCG) presente en suero

Técnicas de inmunofluorescencia

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación.

Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (longitud de onda más corta) en luz de menor energía (longitud de onda más larga). Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característicos; si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).

Una molécula que fluoresce puede ser fijada en el anticuerpo para ser detectada usando luz UV. Ejemplos de estas moléculas son la Fluoresceína, Rodamina, Texas Red, Cy3 y Cy5 (Figura 14). En la selección de los fluorocromos, uno está limitado por la disponibilidad del juego de filtros del microscopio a utilizar. Muchos juegos de filtros son más compatibles con rodamina o fluoresceína. El Texas red puede ser usado también con un juego de filtros para rodamina.

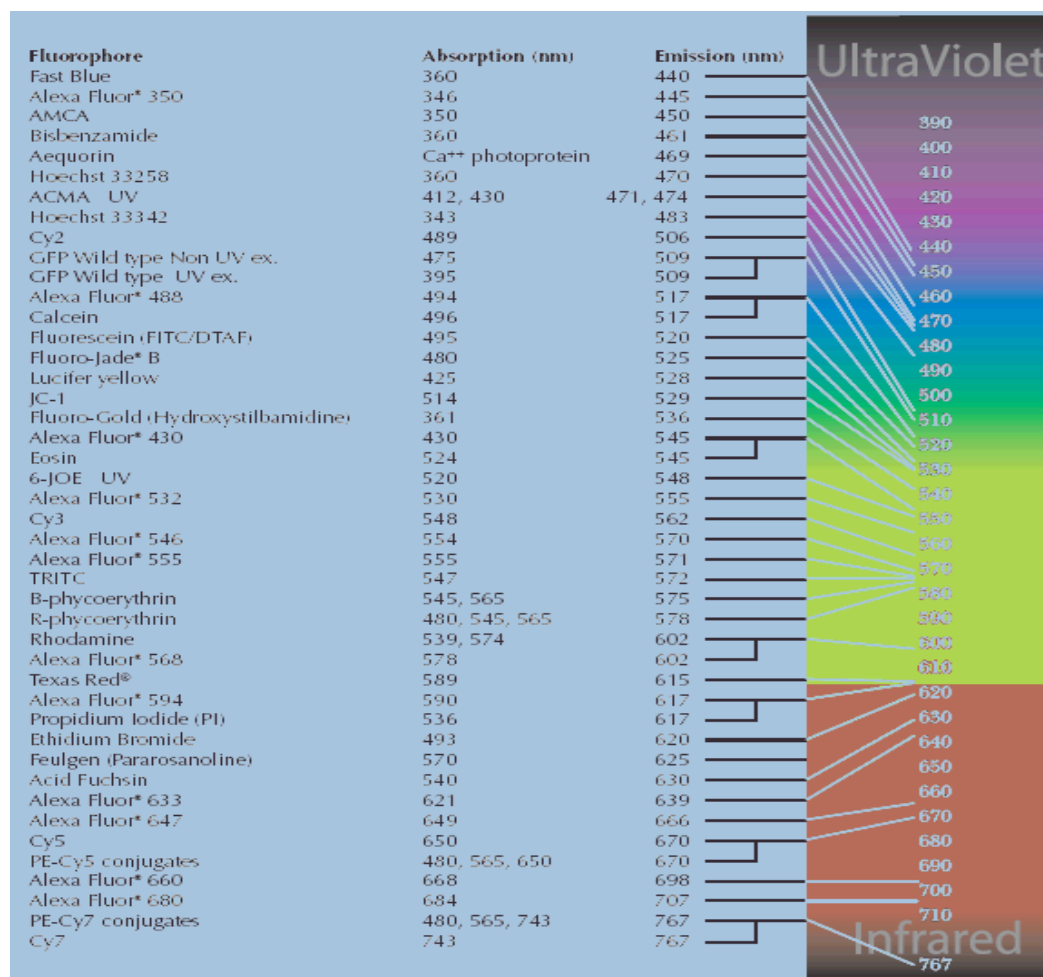


Figura 14. Fluoróforos y sus espectros de absorción y emisión

La inmunofluorescencia se utiliza esencialmente en la detección de autoanticuerpos y anticuerpos contra antígenos de superficie de células y tejidos.

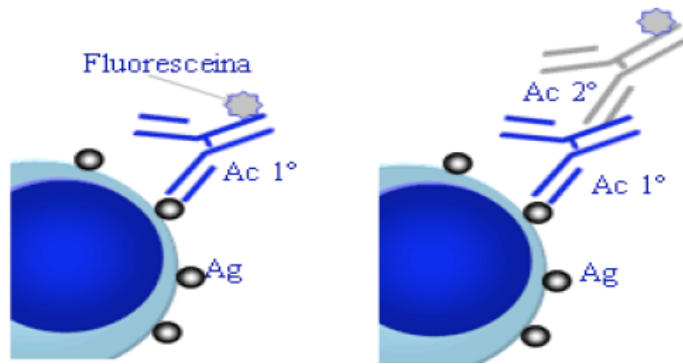


Figura 15. Inmunofluorescencia directa (izquierda) e indirecta (derecha)

Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes (Figura 15). Se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. Este procedimiento (inmunofluorescencia directa) tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los anticuerpos necesarios para cada una de las sustancias a investigar. Para evitar esto, lo que se hace es tratar el tejido o células con antiseros anti-antígeno producidos, por ejemplo, en conejo y secundariamente anti-inmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo (inmunofluorescencia indirecta)

Citometría de flujo

La técnica de inmunofluorescencia se suele utilizar en el estudio de poblaciones de células de sangre periférica. Actualmente el análisis de una suspensión de células vivas marcadas con un fluorocromo se realiza mediante un citómetro de flujo.

La suspensión celular se hace circular en forma de gotas microscópicas. Las células pasan por un campo de detección atravesado por un potente rayo láser que produce la dispersión de la luz y la activación de la fluorescencia. Mediante sensores específicos se analizan y cuantifican las poblaciones en estudio en función de sus propiedades fisicoquímicas y del marcaje efectuado. Para la separación celular este aparato lleva acoplado un sistema que carga eléctricamente las células y con placas deflectoras se realiza su separación (Figura 16). Además de basarse en la detección de la fluorescencia emitida por las células marcadas, también lo hace en otras propiedades diferenciales de las células en estudio como tamaño (FSC), complejidad (SSC), etc. (Figura 17).

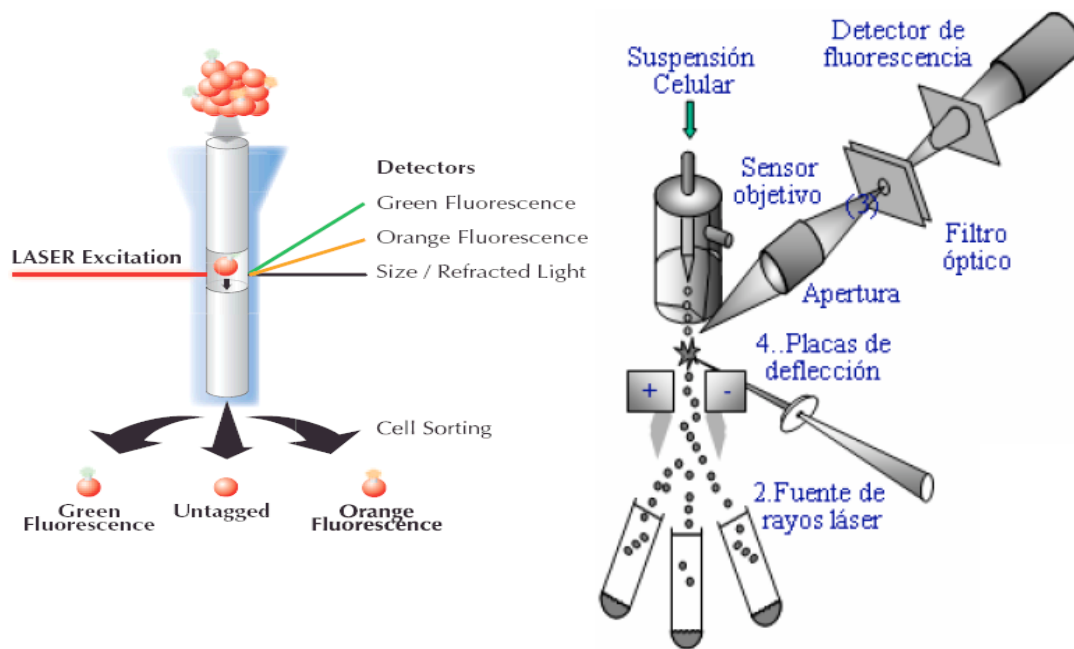


Figura 16. Representaciones de un citómetro de flujo y separación celular (FACS, *Fluorescent Activated Cell Sorter*)

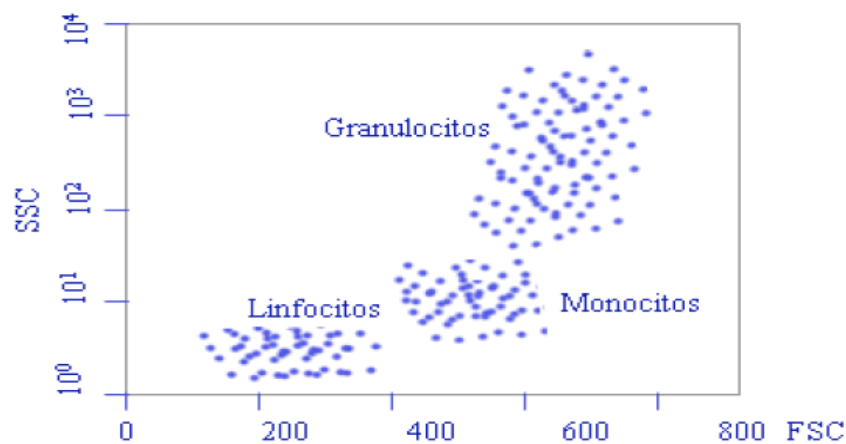


Figura 17. Imagen de dos dimensiones de citometría de flujo (Dot-Plot)

La señal producida como consecuencia de la excitación del fluorocromo, permite conocer el porcentaje de células reconocido por el anticuerpo monoclonal empleado. Como consecuencia se observan imágenes en dos dimensiones (Dot-Plot) (Figura 18).o en una dimensión (Histograma) (Figura 19) en las que se distinguen las diferentes poblaciones celulares marcadas.

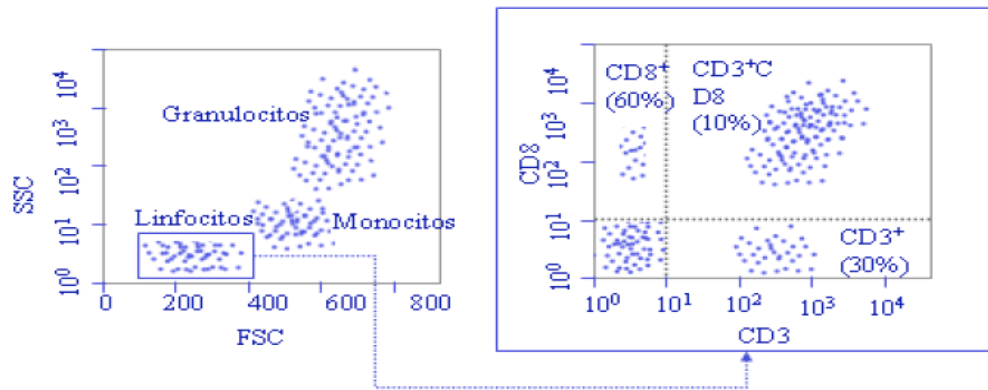


Figura 18. Imagen en dos dimensiones de citometría de flujo (Dot-Plot). Detalle de las subpoblaciones linfocitarias definidas mediante inmunofluorescencia

La puesta a punto de las técnicas de citofluorometría, en las que se conjugan los avances de informática, rayos láser y anticuerpos monoclonales permite el análisis fenotípico y funcional de las células T, B y de todas aquellas células de las que se disponga de un antisuero que las identifique. En la tabla 5 se recogen los valores normales obtenidos en células de sangre periférica.

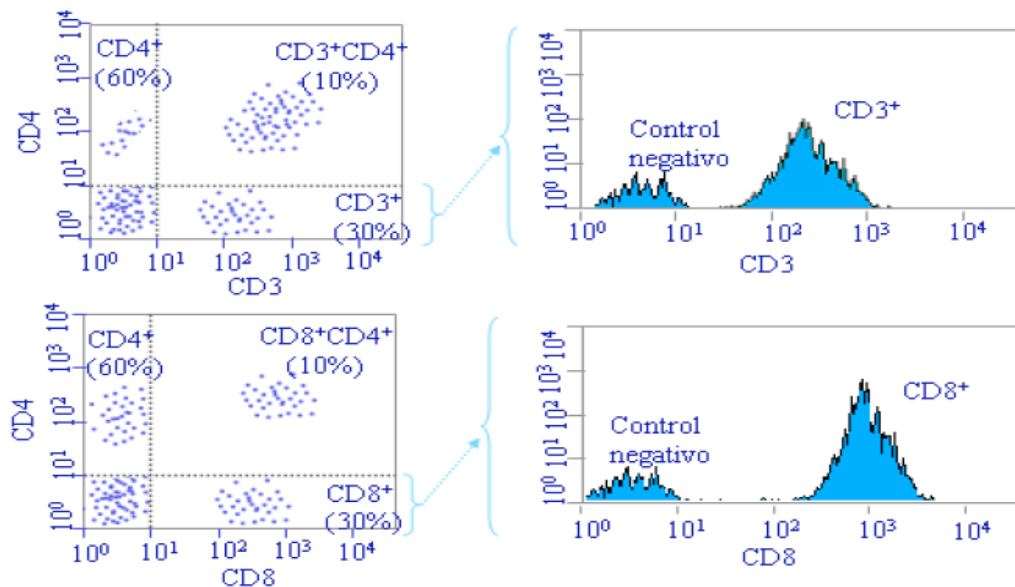


Figura 19. Imagen en una dimensión (histograma) de una de las fluorescencias medidas en el dot-plot

Tabla 5. Niveles en suero de las inmunoglobulinas (mg/dl)

	IgG	IgA	IgM
Recién nacido	500-1000	0-5	0-10
1-3 meses	300-500	2-16	15-30
4-6 meses	300-500	15-30	35-60
6-12 meses	500-700	30-60	60-180
1 a 2 años	600-1200	30-175	60-220
2 a 3 años.	750-1500	70-250	60-250
3 a 4 años	750-1800	90-390	60-280
4 a 7 años	800-1800	90-450	60-280
7 a 10 años	800-1800	90-450	60-280
Adultos	800-1800	90-450	60-280

Marcadores de linfocitos B. Para cuantificar los linfocitos B totales se utiliza el marcador CD19. Por otro lado, en los linfocitos B activados se pierde la expresión de las moléculas CD21, CD22 y CD24, hay un incremento en la expresión de moléculas HLA-DR y de receptores de linfocinas (por ejemplo el receptor de la IL-2) y aparecen marcadores nuevos, como el CD23, ausente en linfocitos B en reposo.

Marcadores de linfocitos T. En este caso se utilizan los marcadores CD3, CD4 y CD8 presentes de forma específica en linfocitos T totales y en la subpoblaciones de células T de colaboración y citotóxicas/supresoras respectivamente. En el proceso de activación celular T se expresan nuevas moléculas de superficie, son principalmente receptores para factores de crecimiento y proliferación celular. Entre estos nuevos antígenos de activación expresados en la superficie celular se incluyen: a) receptores de interleucinas (como la molécula CD25 que corresponde a la cadena p55 del receptor de la IL-2); b) receptores de la insulina y de la transferrina (CD71); c) antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, que no están presentes en linfocitos T en reposo; y d) una gran variedad de moléculas de superficie, cuya función no es totalmente conocida (por ejemplo, CD26, CD29, VLA-2, CD69).

$$n(\text{Ac}) + c(\text{Ag}) + m(\text{Ag}^*) \rightleftharpoons h(\text{Ag-Ac}) + j(\text{Ag}^*-\text{Ac}) + k(\text{Ag}^*) + i(\text{Ag})$$

donde: Ac: Anticuerpo; Ag: Antígeno (sustancia a cuantificar); Ag*: Antígeno marcado con un isótopo; Ag-Ac: Complejos de anticuerpos y antígenos no marcados y Ag*-Ac: Complejos de anticuerpos y antígenos marcados.

Técnica de radioinmunoensayo

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en la competencia que se establece, para unirse a anticuerpos específicos, entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo. Al establecerse esta competición resulta que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une al anticuerpo y viceversa.

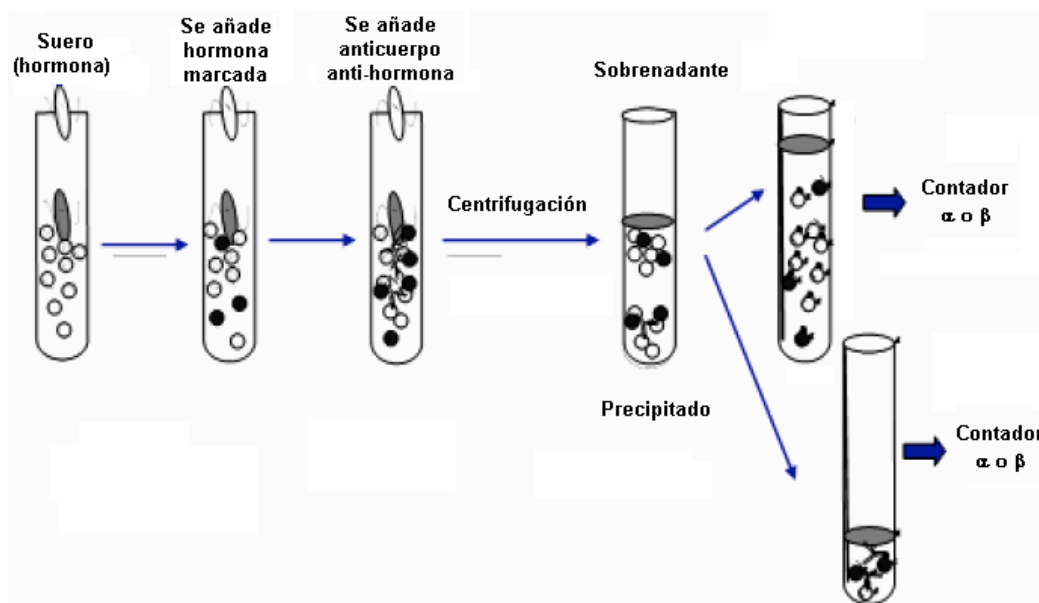


Figura 20. Esquema del principio general de radioinmunoensayo para medir hormonas

Este tipo de reacción se encuentra esquematizado en la Figura 20. Los resultados se obtienen al medir la radiactividad de la hormona marcada unida al anticuerpo y la de la hormona marcada libre mediante un contador de centelleo. Al centrifugar, la hormona libre queda en solución y la hormona unida al anticuerpo forma agregados fácilmente precipitables.

Una vez medida la radiactividad se construye una curva con los resultados obtenidos con cantidades conocidas de hormona sin marcar y marcada. A esta curva se llevan los valores obtenidos de los sueros problema y se obtiene la concentración de la hormona no marcada a investigar.

En el RIA directo, a la fase sólida se une una cantidad conocida de Ac. Diferentes concentraciones conocidas de antígeno marcado se incuban con una concentración constante de la muestra de la que se desea conocer la concentración del antígeno en cuestión.

El fundamento y la detección no sufrirían cambios respecto lo anteriormente comentado. El RIA de inhibición también sería una técnica competitiva de análisis pero lo que se une a la fase sólida es una cantidad fija de antígeno. Para el proceso de inhibición se incubaba una concentración fija de anticuerpo marcado frente a una serie de diluciones de la muestra que contiene el antígeno. Existe una técnica no competitiva que es el denominado sándwich: Se une un Ac en cantidades constantes a la fase sólida. Una vez realizado el bloqueo, se añade el antígeno en concentraciones variables. Posteriormente se añade un segundo anticuerpo contra el antígeno, pero esta vez marcado. Además del radioinmunoensayo antes descrito hemos de considerar que, en la actualidad, es cada vez más frecuente el empleo de inmunoglobulinas marcadas con isótopos radiactivos para su posterior aplicación en diferentes campos: trazador en determinaciones *in vitro* de antígenos específicos, en técnicas inmunorradiohistológicas y técnicas de análisis no competitivo que pueden ser una

alternativa al RIA en la determinación de algunas moléculas que no pueden ser marcadas directamente con radioyodo, en la detección de tumores primarios o metastáticos (inmunoescintigrafía) e incluso la posibilidad de irradiación local de células neoplásicas (immunorradioterapia).

Todas las posibilidades anteriormente indicadas se basan en la posibilidad de marcar el anticuerpo con radioyodo sin mermar su inmunorreactividad. El marcaje de proteínas o péptidos con yodo radiactivo I125 ó I132 puede realizarse por diferentes métodos. La incorporación del yodo a la molécula se realiza en los aminoácidos aromáticos que forman parte de la estructura de la cadena peptídica: tiroxina, fenilalanina, triptófano o histidina.

La técnica del radioinmunoensayo posee algunos inconvenientes que derivan de la necesidad de utilizar isótopos. Además de su peligrosidad y la obligatoriedad de disponer de instalaciones adecuadas para su utilización, existen isótopos que tienen el inconveniente de su pronta caducidad.

Técnica de enzimoimmunoensayo.

Esta técnica, también se conoce como ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas, bien unidas al antígeno, o bien unidas al anticuerpo. El ensayo de ELISA puede ser **directo o no competitivo**, constando de los siguientes pasos:

- a) Se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar.
- b) Se añade la muestra con el antígeno.
- c) Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA (Figura 21), e **indirecto o competitivo**, se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa.

Esta técnica se utiliza para la medida de hormonas, antígenos de la hepatitis y otras muchas sustancias que se encuentran a muy bajas concentraciones.

Una variante de esta técnica de gran utilidad se conoce como ensayo en fase sólida y está orientada a la determinación de anticuerpos frente a un determinado antígeno. Para ello el antígeno se encuentra fijo a un soporte (por ejemplo tubo de plástico). Al añadir la muestra con el posible anticuerpo se unirá y podrá ser detectado añadiendo anti-inmunoglobulinas marcadas con el enzima.

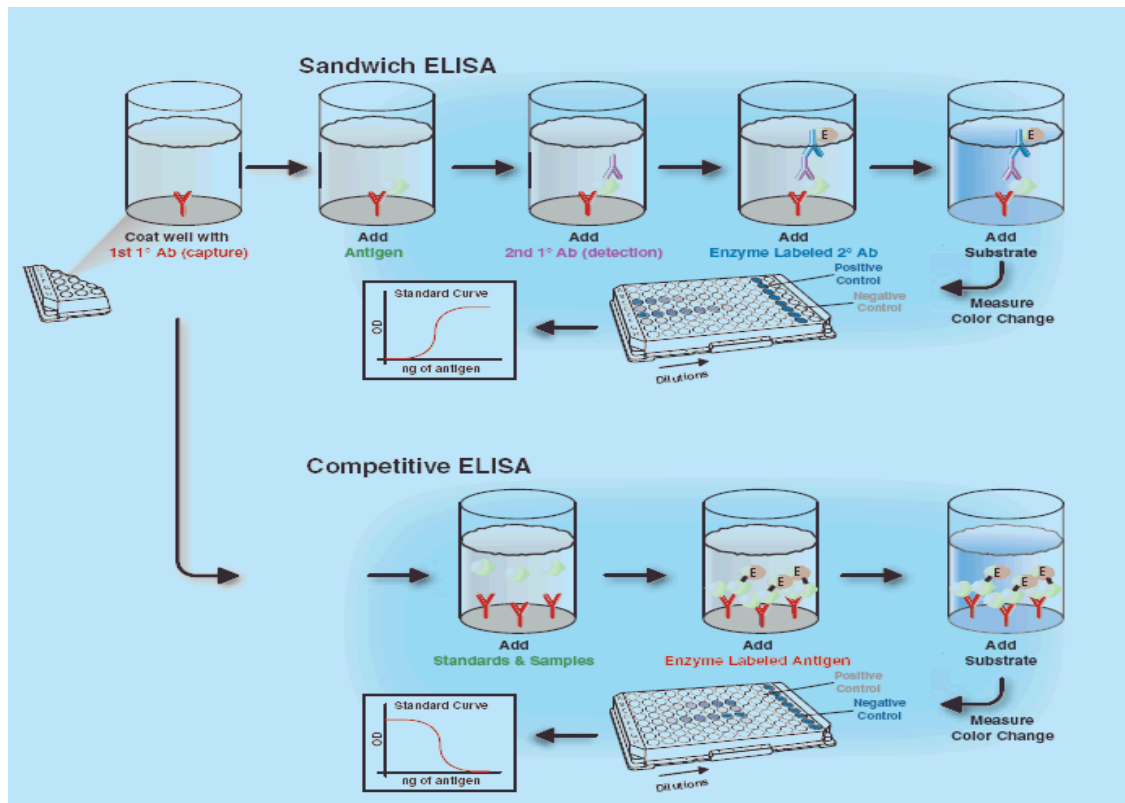


Figura 21. Principio básico de la técnica de ELISA indirecto o competitivo y directo o no competitivo

Otra variante de las aplicaciones inmunoenzimáticas es cuando el antígeno se encuentra fijo en células o tejidos. Al igual que hemos visto en el apartado de inmunofluorescencia indirecta, en este caso también se emplean dos anticuerpos. El primero, con actividad frente a los antígenos a estudiar, y el segundo, que va dirigido frente al primero y que actúa de puente con el complejo portador de la enzima. Cuando la enzima es la peroxidasa, este complejo suele ser una peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Figura 22).

La diferencia principal entre las técnicas de RIA y ELISA es que la primera utiliza como marcador un isótopo y la segunda la actividad de un enzima, así el RIA directo y el ELISA competitivo serían equivalentes, y también existiría ELISA de inhibición y ELISA en sándwich.

El ensayo ELISA tipo sándwich es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser

reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

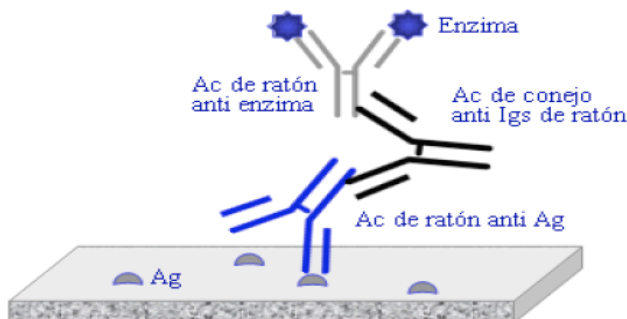


Figura 22. Técnica de peroxidasa aplicada a tejidos

Existen inmunoensayos que se denominan homogéneos en los cuales no es necesario la separación de necesario la separación de los inmunocomplejos de los reactivos libres. Son técnicas muchas de ellas patentadas por diferentes firmas comerciales.

En la tabla 6 se recogen los marcadores enzimáticos más comúnmente empleados en ensayos ELISA, los sustratos que se emplean para su revelado y el modo de prepararlos.

Nefelometría

Esta técnica se basa en la detección de los complejos Ag-Ac, por la refracción que dichos complejos producen sobre rayos de luz que se hacen pasar por el tubo con el antígeno y el anticuerpo correspondiente. Habitualmente se utilizan rayos láser y se establece una relación entre la cantidad de luz que llega y la cantidad de complejos formados (Figura 23).

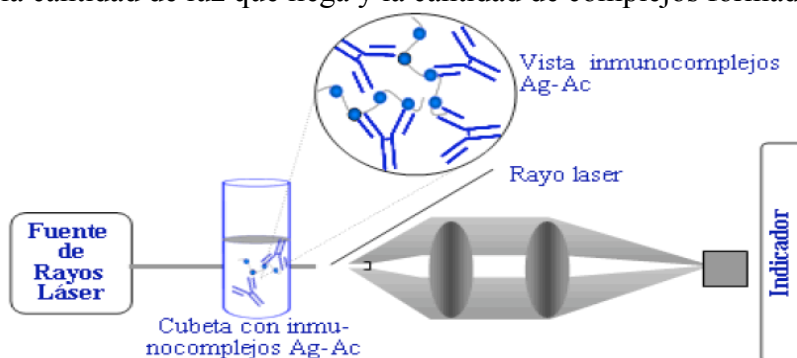


Figura 23. Esquema de un nefelómetro. Los complejos Ag-Ac formados son cuantificados por el grado de difracción.

Tabla 6. Marcadores enzimáticos más comúnmente utilizados

Enzima	Sustrato	Tampón
HRP (peroxidasa de rábano)	OPD	10mg/25mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; añadir μ L de 30% peróxido de hidrógeno 30%
	TMB	2.5mg/250 μ L de DMSO; hasta 25mL con tampón citrato sódico 0.1M pH 6; añadir 5 μ L de peróxido de hidrógeno 30%
	ABTS	60mg/100mL de tampón citrato sódico 0.1 M pH 6; añadir 35 μ L de peróxido de hidrógeno 30%; parar con fluoruro sódico 1.25%; leer a 405nm
	DAB	10mg/20mL de tampón Tris 50mM pH 7.4; filtrar y añadir 20 μ L de peróxido de hidrógeno 1%
	CNP	6mg en 1mL de metanol; añadir 10mL de tampón Tris 50mM pH 7.4; filtrar y añadir 40 μ L de peróxido de hidrógeno 30%
	AEC	80mg en 1mL de N,N'-dimetilformamida + 200 μ L de tampón acetato 0.1 M pH 4.5; filtrar y añadir 50 μ L de peróxido de hidrógeno 30%
	ASA	80mg/100mL de agua destilada caliente; ajustar a pH 6.0 con 1mM NaOH y añadir 10 % por volumen de 0.05% peróxido de hidrógeno; parar con 25 μ L de NaOH 1M
AP (Fosfatasa alcalina)	PNPP	5mg/5mL de tampón dietanolamina-HCl 0.1M pH 9.8 +1mM cloruro de magnesio
	NAPFB	(A) 4mg de fosfato de naftol en 200 μ L de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10mg de sal Fast Blue BB/ 10mL de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.
	NAPR	(A) 4mg de fosfato de naftol en 200 μ L de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10mg de sal Red BB/ 10mL de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.
beta-G	BCIP	1mg/mL en solución AMP (2-amino-2-metil-propanol)
	ONPG	2.5mg/ml en tampón fosfato sódico 0.1M pH 7.0 + 1mM cloruro de magnesio + 0.1M beta-mercaptoetanol
ureasa	BP	8mg/1.48ml de 0.01M NaOH; llevarlo a 100mL con agua desionizada; añadir 100mg de urea y EDTA a 0.2mM; ajustar el pH a 4.8 con 1mM NaOH o HCl; almacenar a 4°C
PG	IS	Añadir a cada placa de ELISA 25 μ L de cada uno de los reactivos siguientes en secuencia : (A) 1% (peso/vol) gelatina en 0.1M tampón fosfato pH 7.0, (B) 1% (peso/vol) almidón en agua destilada caliente, (C) 3.04mg/mL de benzil-penicilina en 0.1M tampón fosfato pH 7.0 (5000 U/mL), (D) 0.01 N ioduro en 0.1M KI solución stock (en una botella oscura)

Si el antígeno se agrega a una solución con exceso de anticuerpos, la cantidad de complejos que pueden evaluarse por la dispersión de la luz en un nefelómetro se relaciona de manera lineal con la concentración de antígeno. Con la disponibilidad de una amplia gama de

anticuerpos monoclonales que facilita la estandarización del método, la nefelometría está reemplazando a la SRID para la estimación de inmunoglobulinas, C3, C4, haptoglobina, ceruloplasmina y PCR. Es posible analizar muestras de volumen muy pequeño, en el orden de 1-10 μ L. La turbidez de la muestra puede constituir un problema; es posible realizar blancos carentes de anticuerpos pero una solución más satisfactoria es seguir la proporción de formación de complejos que es proporcional a la concentración del antígeno, dado que esto evita la necesidad de un blanco separado (Figura 24). Debido a que los complejos solubles comienzan a formarse en exceso de antígeno, es importante asegurar que el valor del antígeno se obtuvo en un exceso de anticuerpo en la cual se incluye más antígeno.

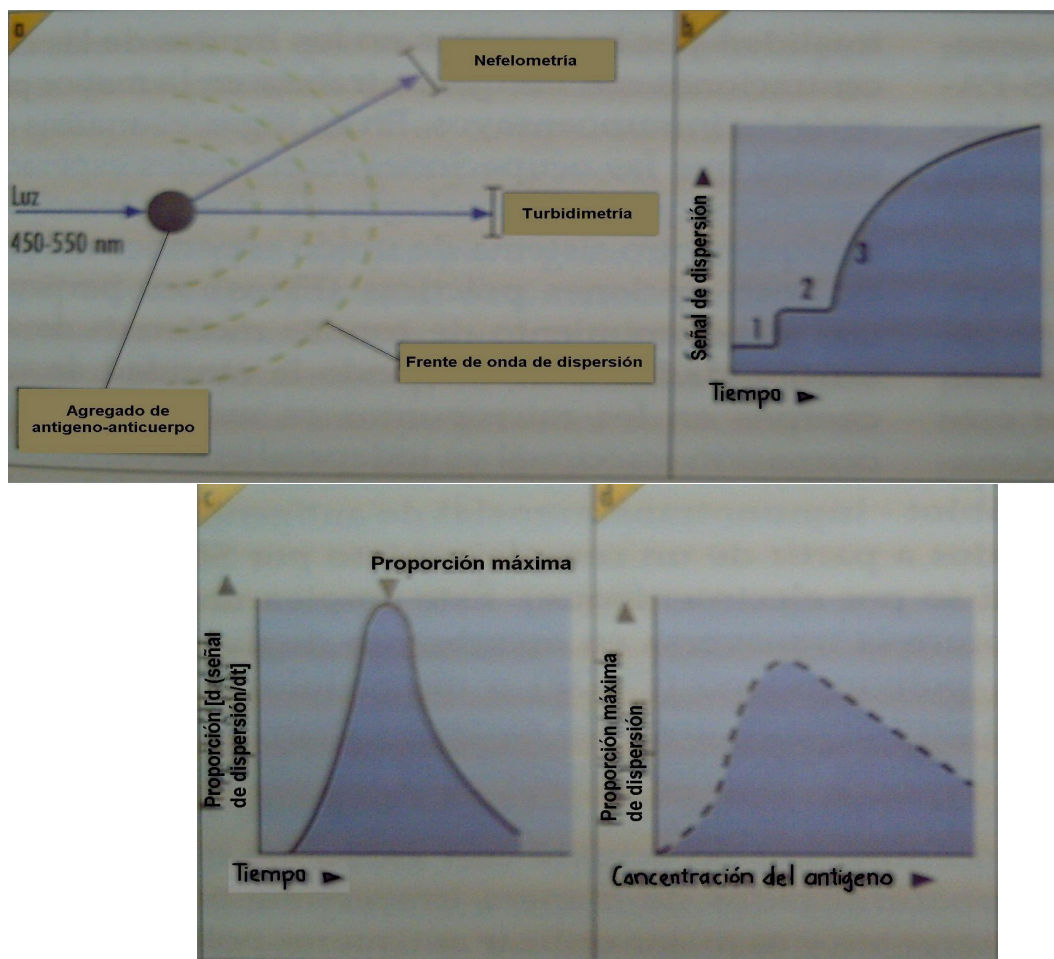


Figura 24. Nefelometría proporcional. a) Cuando se añade el antisuero, se forman pequeños agregados de Ag-Ac que dispersan la luz incidente filtrada para dar una banda de longitud de onda de 450-550nm. Para la nefelometría se mide la dispersión de la luz en un ángulo de 70°. b) Después de añadir la muestra (1) y luego el Ac (2), se determina la proporción en la que se forma el agregado (3) a partir de la señal de dispersión. c) Un software calcula luego la máxima proporción de dispersión de la luz que se relaciona con la concentración del Ag, como se muestra en d)

Este procedimiento es rápido y sensible y se está utilizando en la actualidad, sobre todo, para la cuantificación de proteínas en suero y en otros líquidos biológicos.

Selección de células unidas a un anticuerpo

En la actualidad se dispone de varios métodos para seleccionar células a las que previamente se ha unido un anticuerpo. La adición de complemento elimina dicha población celular (selección negativa), es la denominada técnica de inmunotoxicidad.

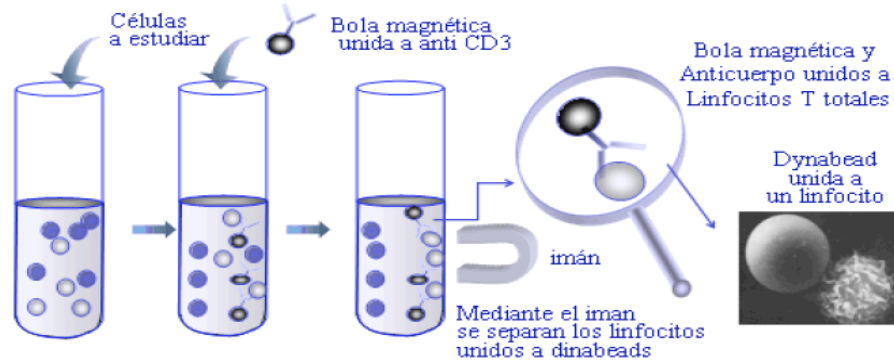


Figura 25. Fundamento de la separación celular empleando la técnica de Dynabeads

La separación inmunomagnética se basa en la interacción entre antígenos celulares superficiales y anticuerpos unidos a bolas magnéticas (Figura 25). La aplicación de un campo magnético permite separar las células unidas a las bolas (selección positiva) de las células no unidas (selección negativa).

Es un método fácil, rápido y no muy costoso. Este método presenta muchas aplicaciones no sólo en Inmunología sino también en Microbiología, utilizando bolas unidas a anticuerpos frente a un determinado microorganismo; en Biología Molecular para aislamiento de DNA y mRNA utilizando bolas a las que se adsorbe el DNA y bolas unidas a una secuencia de oligonucleótidos respectivamente. También se pueden usar para la purificación de proteínas si se unen las bolas a anticuerpos específicos.

La separación de células puede realizarse mediante el FACS (fluorescence activated cell sorting) en la que además de los dispositivos de citometría ya mencionados se dispone de mecanismos de separación celular en función de la fluorescencia emitida por las células marcadas con anticuerpos. Esta es la técnica que actualmente ofrece mejores resultados.

Purificación de antígenos y anticuerpos por cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una técnica usada en el aislamiento de anticuerpos o antígenos puros. El principio es simple y su aplicación, muy amplia. El antígeno o el anticuerpo está unido a través de sus grupos aminados libres a las partículas de Sepharose activadas con bromuro de cianógeno. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos insolubilizados para extraer el antígeno correspondiente de la solución, en la que está presente como un componente de una mezcla compleja, por absorción a su superficie. Los residuos que no interesan son eliminados por lavado y el ligando requerido es liberado del

absorbente de afinidad mediante la ruptura de los enlaces antígeno-anticuerpo por variaciones de pH o por el agregado de iones caotrópicos como el tiocianato (Figura 26). Del mismo modo, puede utilizarse un antígeno a partir de una mezcla de donde puede purificarse por elusión.

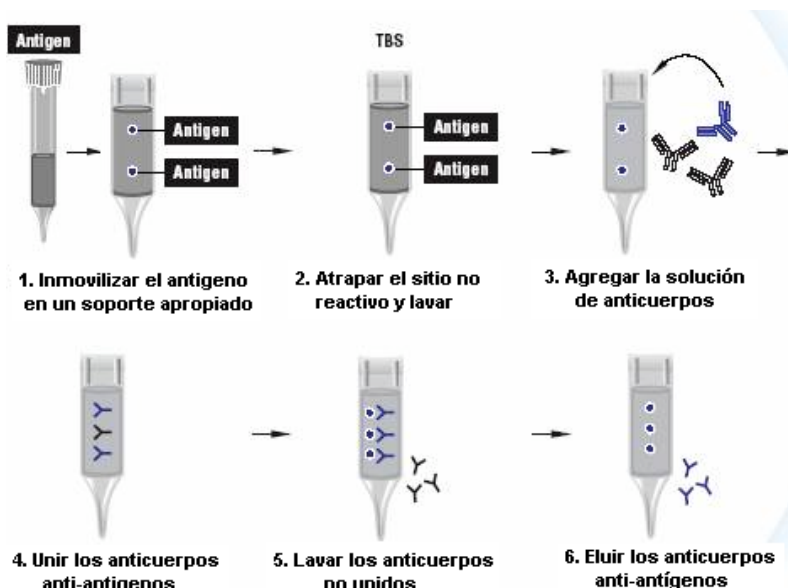


Figura 26. Purificación de anticuerpos típica usando un antígeno inmovilizado en columna

La cromatografía de afinidad es una técnica ampliamente utilizada en Bioquímica e Inmunología. Puede aplicarse en el aislamiento de una población pura de anticuerpos. Para ello se prepara un inmuoabsorbente en fase sólida, que es un antígeno unido covalentemente a un soporte inerte, como otro ejemplo bolitas de dextrano entrecruzadas. El inmuoabsorbente, se coloca en una columna y la mezcla de anticuerpos se hace pasar a través de él bajo condiciones fisiológicas. Los anticuerpos específicos para el antígeno permanecen unidos a la columna, y aquellos que no se unen son eliminados mediante lavado. En el segundo paso, se eluye la columna, usando un tampón de elución que disocia la unión antígeno-anticuerpo (por ej., acetato a pH 3.0) para obtener el anticuerpo que se unió al inmuoabsorbente. A la inversa, colocando anticuerpos en la columna se tendrá antígeno puro. Esta técnica permite obtener otros tipos de moléculas. Así una columna de lectina absorberá todas las moléculas con determinados residuos azúcar, que pueden eluirse en un tampón con el azúcar libre, ya que éste compite con la proteína ligada por los sitios de unión a la lectina.

Inmunoprecipitación e inmunoblotting

La inmunoprecipitación es una de las técnicas inmunológicas más útiles cuando se asocia a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. De este modo se pueden determinar la presencia y cantidad de un antígeno, el peso molecular relativo de una cadena polipeptídica, su síntesis y degradación, la interacción con proteínas, ácidos nucleicos u otros ligandos. La técnica de inmunoprecipitación se divide en seis pasos:

1. Marcaje del antígeno (opcional)
2. Preparación de las muestras: Lisis de las células para liberar el Ag
3. Formación del complejo Ag-Ac
4. Precipitación de los complejos Ag-Ac
5. Purificación de los inmunocomplejos
6. Análisis

En la mayoría de los casos el antígeno se marca incubándolo con un precursor radiactivo aunque muchos antígenos se pueden detectar por medios que no requieren marcaje directo. El antígeno se extrae de las células mediante lisis. Después, los anticuerpos se añaden al lisado y se forman los inmunocomplejos Ag-Ac. Estos se unen por adsorción a una fase sólida que contiene proteína A.

Los inmunocomplejos se analizan generalmente por electroforesis en gel pero también pueden ser usados en diferentes técnicas incluyendo estudios enzimáticos, unión a ligandos, inmunizaciones, inmunoblotting, etc. La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots'. Una de las técnicas de inmunoblotting es el Western blot que combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmunoquímica.

Western Blot, Dot Blot y Slot Blot

Se utiliza para determinar la presencia y cantidad de antígenos y de anticuerpos específicos. En la actualidad el Western blot es el estudio confirmatorio más empleado para el diagnóstico del SIDA. Se emplean antígenos virales obtenidos por cultivo celular. Mediante electroforesis se separan las diferentes proteínas víricas por su diferente peso molecular. Posteriormente se transfieren a papel de nitrocelulosa y secundariamente se incuban con el suero problema. Los anticuerpos se detectan añadiendo una anti-IgG humana marcada con una enzima (peroxidasa) que produce una banda coloreada al añadir un sustrato. Esta técnica identifica anticuerpos específicos frente a las distintas proteínas del VIH (Figura 27). Las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el Prof. E. Southern ('Southern blotting') y por ello se le denominó 'Western'.

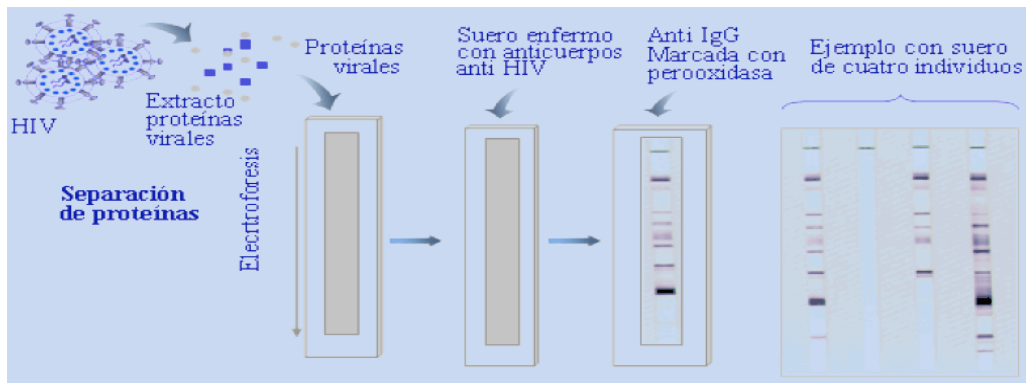


Figura 27. Técnica de inmunoblotting. Consiste en la separación electroforética de proteínas virales, y posterior revelado con anti-IgG marcada con peroxidasa

Hay sin embargo otros métodos de transferir o aplicar proteínas sobre una membrana. El más sencillo es aplicarlas directamente en forma de una pequeña gota de una solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o 'dot' (es el caso del 'dot blot'. Existen dispositivos que facilitan la aplicación de las proteínas directamente a la membrana, aplicando una succión que facilita la penetración de la solución, y reciben los nombres de 'dot blot' o 'slot blot' en función de que la proteína quede aplicada en forma de una gota circular o de una línea (Figura 28).

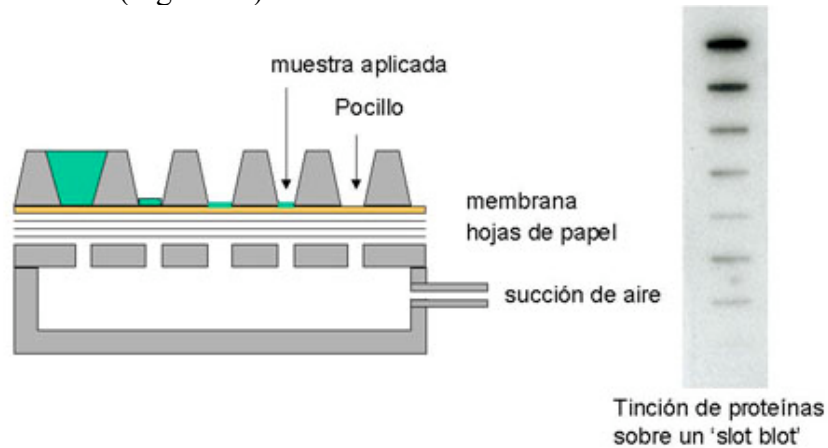


Figura 28. Esquema de una aparato de aplicación directa de soluciones de proteína sobre una membrana (dot blot/spot blot)

Trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre el emplearlas dentro del propio gel:

- son más rápidas de teñir y desteñir.
- no se produce tinción de los anfolitos en los geles de isoelectroenfoque.
- se detectan cantidades menores de proteínas pues se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel.
- el blot es un registro conveniente y cómodo de manipular del gel.

- las membranas son mucho más fáciles de manipular que el propio gel

Todo procedimiento de blotting consta de 5 etapas:

- Inmovilización de proteínas sobre la membrana ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión, etc.) o mediante aplicación directa.
- Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
- Incubación del blot con anticuerpo primarios contra la/s proteína/s de interés.
- Incubación del blot con anticuerpos secundarios, o reactivos que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
- Las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

Hay tres métodos para transferir proteínas a las membranas:

- Transferencia capilar
- Transferencia por difusión
- Transferencia electroforética ('electroblotting')

Detección específica de proteínas en filtros

Una proteína específica puede ser identificada y visualizada en un Western blot empleando técnicas de inmunodetección (técnicas que emplean la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos a sus antígenos). En Western blot se emplea comúnmente el sistema de inmunodetección indirecta que se representa en la figura 29. En este método se emplea un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, marcado con un enzima, y contra la especie en la que se ha producido el primero, se emplea para localizar donde se formaron los complejos antígeno-anticuerpo. Este anticuerpo secundario se puede marcar de formas muy diversas con el fin de producir una señal detectable (por ejemplo una señal sobre una película radiográfica o una mancha de color en el filtro). En ocasiones se emplean en lugar del anticuerpo secundario proteína A o proteína G.

Bloqueo de la membrana

Una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es el bloqueo, para prevenir la unión no específica del sistema de detección a la membrana, con el riesgo asociado de tener un elevado 'background' o falsos positivos.

Se han descrito numerosas soluciones bloqueantes, y todas ellas son efectivas. El factor esencial a tener en cuenta es elegir un sistema de bloqueo compatible con el sistema de detección empleado. Por ejemplo, las soluciones de bloqueo que contienen leche desnatada contienen una gran cantidad de carbohidratos complejos, y por ello deben descartarse cuando se van a emplear anticuerpos que reconocen determinantes en carbohidratos, o por ejemplo se ha de evitar el uso de suero completo si en la detección se emplea proteína A o proteína G.

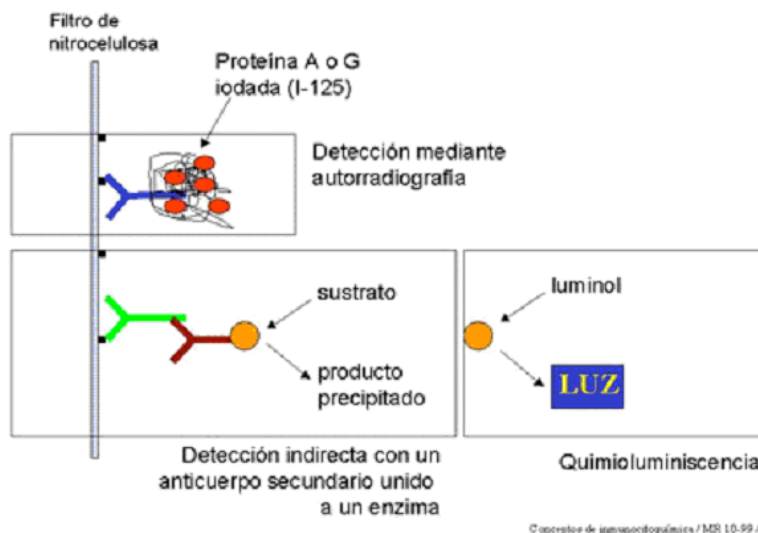


Figura 29. Métodos de detección en Western blot

Las dos soluciones de bloqueo que son compatibles con casi cualquier sistema de detección son las soluciones de leche desnatada y las soluciones de albúmina sérica bovina (BSA). También se recomienda el bloqueo en Tween-20 si hay demasiado 'background'. Sin embargo es conveniente usar con cuidado los detergentes no iónicos como Tween-20 pues pueden solubilizar las proteínas transferidas al filtro.

En la tabla 7 se recogen algunas de las soluciones de bloqueo más comúnmente empleadas:

Tabla 7. Soluciones de bloqueo más comunes en Western blotting

Agente bloqueante	Características
Leche en polvo	5% de leche desnatada en PBS /TBS. Muy económico. Con poco 'background'. Se deteriora con rapidez. Es posible que tape algunos antígenos.
Leche / Tween-20	Económico. 5% de leche desnatada en PBS/TBS - 01% Tween-20. Con poco 'background'. Se deteriora con rapidez. Es posible que tape algunos antígenos.
Tween-20	0.1% Tween-20, 0.02% azida sódica en PBS/TBS. Económico. Permite la tinción después de la inmunodetección. Puede quedar un 'background' residual.
BSA	3% BSA, 0,02% azida sódica en PBS. Bueno. Relativamente económico.
Suero de caballo	10% suero de caballo, 0,02% azida sódica en PBS. Sin 'background'. Moderadamente caro. Incompatible con algunos anticuerpos anti-inmunoglobulinas.

Tinción de proteínas en el filtro

Habitualmente se emplean técnicas de tinción de proteínas sobre el filtro como control de la transferencia. Existen diferentes métodos para teñir todas las proteínas presentes en el filtro, pero los que más interés despiertan son los métodos de tinción de proteínas específicas a partir de mezclas complejas separadas en geles y transferidos a filtros, son los métodos de tinción específicos, usualmente basados en métodos inmunoquímicos.

Colorantes

Los colorantes que permiten teñir las proteínas en los geles de poliacrilamida no son utilizables en los filtros pues se unen inespecíficamente a éstos. Para teñir las proteínas en los filtros se emplean: Ponceau S, Tinta china o Negro amido.

Ponceau S se emplea en forma de solución acuosa. La tinción es rápida pero no es permanente y puede desaparecer en el procesamiento posterior. Como la tinción desaparece es compatible con casi todos los procedimientos de detección con anticuerpos.

El método de tinción de filtros con tinta china es reproducible, sensible y permanente, y no interfiere con los procedimientos de inmunodetección, pero puede tapar la tinción colorimétrica del proceso inmunoquímico. La tinción se basa en la adherencia preferente de las partículas coloidales de carbón de la tinta sobre las proteínas inmovilizadas. La destinción se hace en PBS.

El negro amido es menos sensible que la tinta china. Las bandas aparecen negras sobre un fondo azul claro. Después de la tinción se destiñe con una solución de metanol/ácido acético. Este método de tinción es incompatible con la inmunodetección posterior.

Tinción mediante biotina-estreptavidina

Este método de tinción se basa en la afinidad de la estreptavidina por la biotina. Los grupos amino primarios y secundarios de las proteínas unidas a la nitrocelulosa se pueden biotinilar empleando un derivado N-hidroxido succinimida de la biotina que contiene un brazo espaciador hidrofóbico. Un lavado posterior elimina el exceso de biotina y después se bloquea la membrana con una solución de leche en polvo. Las proteínas biotiniladas pueden ser detectadas empleando un complejo preformado de estreptavidina-enzima y el sistema de detección de la actividad enzimática (Figura 30).

Tinción mediante oro coloidal

Existen productos comerciales como AuroDye-R de Amersham que actúa como colorante para proteínas sobre filtros. Se trata de una solución coloidal estabilizada de oro a pH 3. A este pH las partículas de oro están cargadas negativamente y se unen específicamente a las proteínas. No se puede usar sobre membranas de Nylon pues se une no específicamente a las cargas de la membrana. El color obtenido es rojo oscuro. Existen sistemas de amplificación de señal. Este método tiene una sensibilidad similar al de la tinción con plata de los geles.

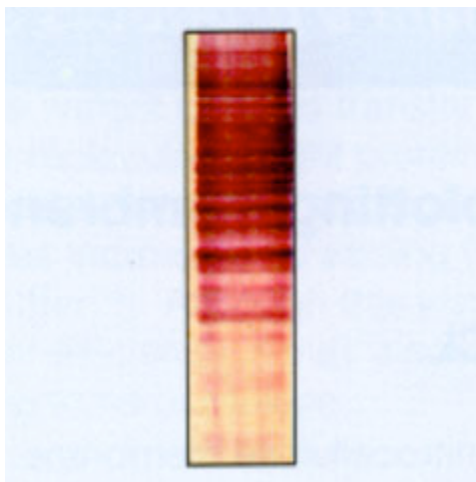


Figura 30. Detección de proteína total en un Western blot usando biotina-estreptavidina

Análisis de interacciones moleculares

La técnica utilizada en el análisis de interacciones moleculares en el **BIAcore** se basa en un fenómeno óptico, el principio de resonancia del plasmón de superficie (**SPR**). Al iluminar con luz polarizada una interfase entre medios con diferente índice de refracción separados por una lámina de material conductor se puede apreciar una sombra en su reflejo. Esta zona de sombra se debe al acoplamiento entre la energía de la luz incidente y los plasmones de superficie de la película conductora que separa los dos medios. El ángulo de esta sombra con la interfase depende directamente del índice de refracción del medio donde se propaga la onda evanescente, es decir la cara opuesta a la de la luz incidente y reflejada. Estos cambios se detectan solo cerca de la interfase, ya que la onda evanescente decae de manera exponencial a la distancia de la superficie (Figura 31).

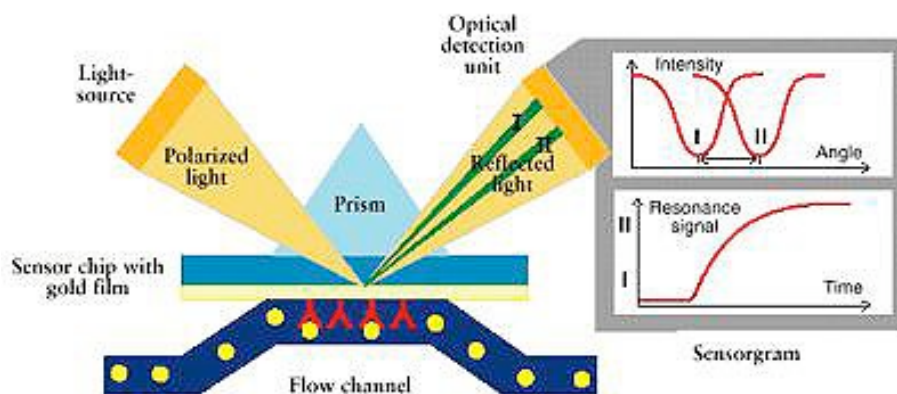


Figura 31. Esquema del principio básico del BIAcore. SPR obtenido por reflexión total interna en una interfase entre vidrio-metal. El instrumento permite el registro de las interacciones en tiempo real entre las macromoléculas (Y invertidas) depositadas en la superficie del biosensor y las moléculas que fluyen por el canal (esferas pequeñas)

En el BIAcore, las interacciones entre biomoléculas cambian la concentración del soluto y por tanto el índice de refracción en la zona de la interacción. El fenómeno SPR permite medir los **cambios de masa** producidos en una superficie entre la molécula unida a la misma y otras en suspensión, en tiempo real, sin necesidad de marcaje y de manera totalmente independiente a la naturaleza de las moléculas que interaccionan.

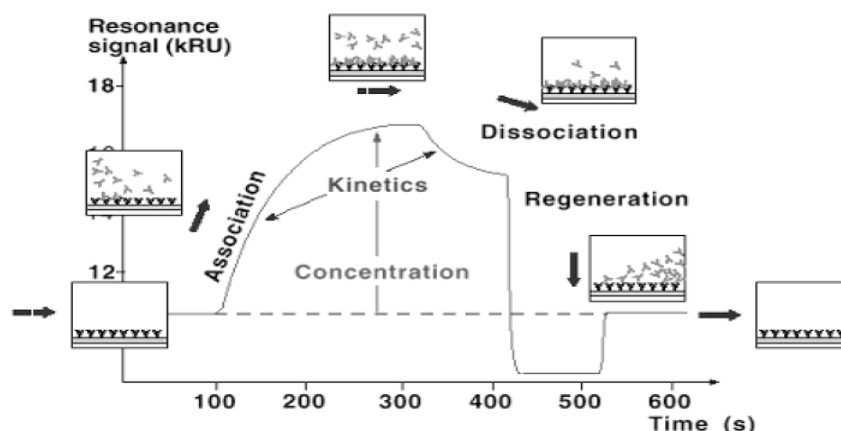


Figura 32. Monitoreo la respuesta del SPR en términos de la unión al receptor

Aplicaciones principales

Interacciones antígeno-anticuerpo (afinidad y cinética de anticuerpos monoclonales, "screening" de anticuerpos).

Diseño de fármacos (caracterización de moléculas modificables).

Interacciones DNA proteína, procesos de elongación e hibridación.

Interacciones celulares (virus, células eucariotas).

Otras técnicas basadas en la unión antígeno-anticuerpo

Hay otros modos para detectar el complejo antígeno-anticuerpo una vez que éste se ha formado, además de los descritos en los apartados anteriores. Son, por ejemplo, las técnicas basadas en el marcaje de anticuerpos con ferritina u oro coloidal, de gran utilidad en microscopía electrónica.

La técnica de anticuerpos marcados con ferritina se basa en el hecho de que casi el 25% de esta molécula está formada por hierro que, al ser opaco a los electrones, puede ser detectado en microscopía electrónica. Los anticuerpos pueden ser combinados a la ferritina (u otras proteínas) mediante ligandos bivalentes como el 1,3-difluoro-4,6-dinitrobenceno o la bencidina bidiazoica entre otros.

La técnica basada en el marcaje de anticuerpos con oro coloidal y su uso en microscopía electrónica se basa, al igual que en el caso anterior, en la opacidad de estas moléculas a los

electrones. Estas técnicas son de gran utilidad en inmunohistología e inmunocitología humana, animal y vegetal aplicado directamente sobre células o secciones de tejidos.

También están tomando cada vez mayor auge las técnicas quimioluminiscentes. La quimioluminiscencia consiste en términos generales en la producción química de la luz. Los marcadores quimioluminiscentes son sustancias capaces de emitir luz cuando, al absorber la energía de una reacción química oxidativa, son colocadas en un estado de excitación electrónica. La emisión de luz se produce al volver a su estado inicial y la energía química absorbida se cede en forma de fotones fácilmente cuantificables con un fotodetector. Los marcadores quimioluminiscentes constituyen una alternativa al uso de isótopos radiactivos en el inmunoanálisis, pues los compuestos quimioluminiscentes son de gran estabilidad y la emisión de luz sólo se produce cuando se provoca la reacción oxidativa siendo posible almacenar largo tiempo los compuestos luminiscentes.

Las técnicas anteriores así como las de inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis e enzimoimmunoensayo pueden realizarse utilizando un sistema de ampliación de las señales empleando el complejo avidina-biotina. La biotina es una vitamina de bajo peso molecular, y la avidina es una glicoproteína, contenida en la clara del huevo. La biotina se une covalentemente al anticuerpo a través de un grupo amina, carboxilo sulfhidrilo o tiosil. Varias moléculas de biotina, pueden unirse a una de anticuerpo y dada la afinidad biotina-avidina resulta que, cada molécula proteica, se verá unida, a través de la biotina, con varias moléculas de avidina a su vez unidas al marcador correspondiente.

Técnicas de biología molecular útiles en inmunología

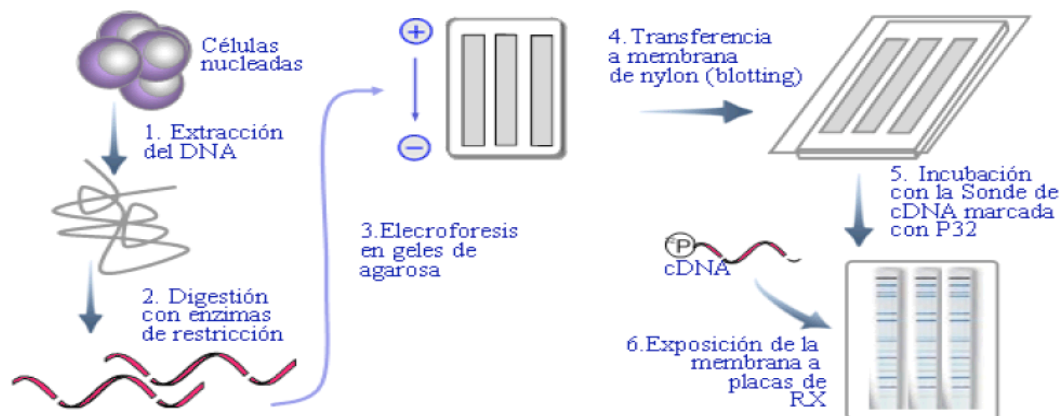


Figura 33. Esquema de un Southern Blot

Southern Blot

Otro grupo de técnicas ampliamente utilizadas en inmunología son de biología molecular. Una de las más utilizadas es la Southern Blot. Esta técnica consiste en la separación de

fragmentos de DNA previamente obtenidos por digestión con enzimas de restricción. La separación se hace mediante electroforesis y después este DNA es transferido a membranas de nylon o nitrocelulosa (blot). Después, para la identificación de la banda que interesa se realiza un proceso llamado hibridación, en el que la membrana es "incubada" con un fragmento de DNA complementario al gen de interés (sonda) previamente marcada, generalmente con un isótopo, lo que permite posteriormente visualizar mediante autoradiografía la banda en la cual se ha producido unión (Figura 33). La técnica de Northern blot permite estudiar ARN en forma análoga al Southern blot.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*)

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA. Esta técnica es especialmente útil para mapear genes o localizar anomalías cromosómicas.

La técnica consiste en preparar cortas secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de DNA que se quieren marcar y examinar. Estas sondas se marcan con moléculas fluorescentes (p. ejemplo con biotina o fluoresceína). Estas sondas se hibridan o unen al DNA complementario y, como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran (Figura 34). A diferencia de otras pruebas utilizadas para estudiar los cromosomas que requieren que las células se encuentren en división activa, la hibridación fluorescente *in situ* puede ser llevada a cabo en células no activas

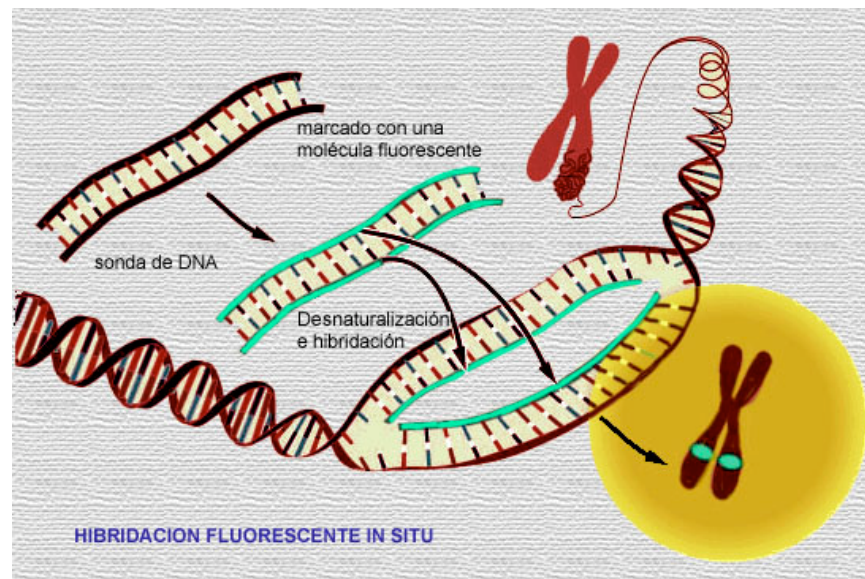


Figura 34. Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

FISH utiliza tres tipos de sonda:

- Sondas específicas de un locus: estas sondas se hibridan a una región particular de un gen. Esta sonda es útil cuando se ha aislado una pequeña parte de un gen y se quiere averiguar en qué cromosoma se encuentra.

- Sondas alfoides o centroméricas: son sondas que contienen secuencias complementarias de las secuencias repetidas que se encuentran en los centrómeros de los cromosomas. Como pueden utilizarse sondas de diferentes colores, cada cromosoma puede ser marcado de manera distinta, con lo que se puede averiguar si un individuo tiene el número correcto de cromosomas o si tiene un cromosoma extra
- Sondas para cromosomas completos: son colecciones de sondas de un tamaño reducido, cada una de las cuales se hibrida a una secuencia diferente a lo largo de todo un cromosoma. Utilizando estas librerías de sondas, se puede marcar todo un cromosoma generando un cariotipo espectral. De esta manera, se consiguen imágenes en color que permiten examinar los cariotipos de una forma más exacta que los tradicionales cariotipos basados en bandas más o menos oscuras. Esta técnica es particularmente útil para examinar anomalías cromosómicas

FISH de Metafase

Esta técnica puede usarse sobre células en metafase para detectar microdeleciones específicas más allá de la resolución de la citogenética de rutina o para identificar material extra de origen desconocido. Puede también ser de ayuda en casos donde es difícil determinar mediante la citogenética de rutina si un cromosoma tiene una deleción simple o está implicado en una reorganización sutil o compleja. Además, FISH de metafase puede detectar algunos de los reordenamientos específicos que se observan en ciertos cánceres.

El número de síndromes de microdeleción diagnosticados por FISH está aumentando con rapidez. La sensibilidad de estos ensayos es en todos los casos mejor que la de la citogenética de rutina, pero depende del síndrome en concreto. En algunos, la sonda es específica para el gen defectuoso, como en el Síndrome de Williams, donde se ha encontrado una deleción en el gen de la elastina en el 96% de los pacientes con diagnóstico confirmado. En otros síndromes como el de Prader-Willi/Angelman, la etiología es heterogénea y las microdeleciones sólo forman una parte de los casos (60%).

FISH de Interfase

La FISH se puede usar sobre células en interfase para determinar el número de copias de uno o varios cromosomas, así como para detectar algunas reorganizaciones específicas que son características de ciertos cánceres. La ventaja principal del FISH de interfase es que se puede realizar muy rápidamente si es preciso, normalmente en 24 horas, porque no requiere crecimiento de las células.

Un buen ejemplo es el ensayo de **Prueba de Aneuploidía**, que se realiza sobre células del fluido amniótico cuando hay una fuerte indicación clínica de una de las trisomías más comunes. Se desnaturalizan los núcleos de la muestra, se hibridan con sondas específicas para los cromosomas 13, 18, 21, X e Y, y los resultados se obtienen comúnmente en 24 horas. La prueba de aneuploidía suele incluir también una citogenética de rutina para confirmar los resultados o detectar cualquier anomalía no detectada por la FISH de interfase.

PCR *in situ*

El PCR *in situ* es una reacción en cadena de polimerasa que tiene lugar dentro de la célula. La amplificación en el PCR *in situ* puede ser llevada a cabo sobre tejidos o células fijas (Figura 35).

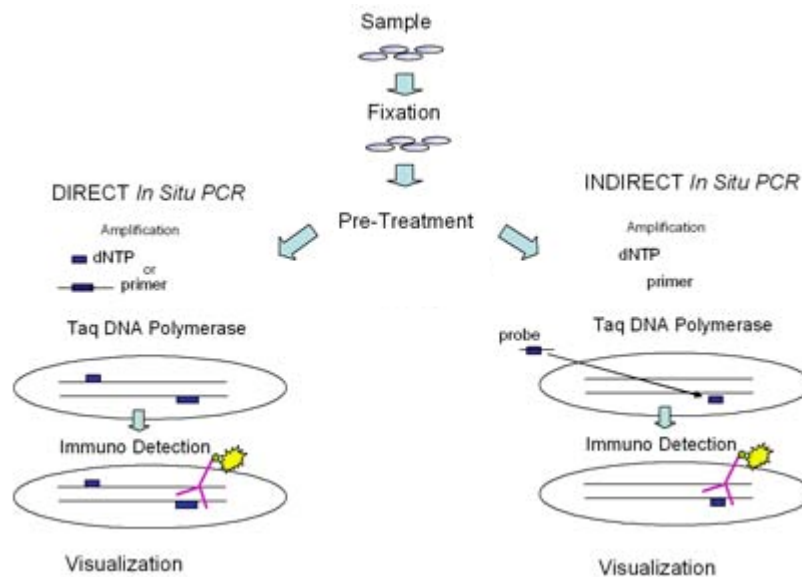


Figura 35. PCR *in situ*, directo e indirecto

Durante el inicio y el progreso de una enfermedad, cantidades mínimas de un producto en pequeñas poblaciones de células o tejidos puede ser vital para la detección de la patogenicidad de la enfermedad. En muchas enfermedades de lento desarrollo, las cuales requieren meses o incluso años para tener manifestaciones clínicas, se ha mostrado que en la mayoría de las poblaciones de células afectadas están en un estado de inactividad transcripcional, y a un nivel de un gen por célula hospedera.

Los métodos de hibridación y PCR han sido empleados para examinar la expresión y detección de cada gen afectado durante la patogénesis. Aunque ambas técnicas son bastante usadas, la desventaja de estas técnicas es que están enfocados a la expresión celular y al estudio de poblaciones. Las secuencias de ácidos nucleicos son aisladas de una población de células que contienen un número suficiente de moléculas que se detectan directamente por técnicas de hibridación estándar, o, cuando una subpoblación contiene una sola copia de la secuencia de ácidos nucleicos, la molécula es amplificada por PCR y detectada después de la amplificación.

El PCR *in situ* aplica la metodología de la técnica de hibridación de ácidos nucleicos a nivel celular. Combinando la citoquímica y la inmunohistoquímica, el PCR *in situ* permite la identificación de marcadores celulares y permite una localización más detallada de secuencias celulares específicas dentro de poblaciones celulares, tal como tejidos y muestras de sangre.

Factores que afectan la sensibilidad del PCR *in situ* incluyen:

- 1) la linealidad de la molécula blanco
- 2) la carencia de una secuencia complementaria próxima a la secuencia blanco mecanismo de la reacción

Mecanismo de la reacción

Es llevada a cabo en un portaobjeto para microscopio Denhardt en el cual células o secciones de tejido han sido fijadas. 5 μ L de la mezcla de PCR es aplicada directamente sobre un punto de la célula la cual ha sido fijada con para-formaldehído; para las secciones de tejido, una cantidad suficiente de la mezcla para humedecer la sección (generalmente de 20 a 40 μ L). Un cubreobjeto es cuidadosamente colocado, y, de una manera similar en las usadas en hibridaciones Southern o Northern, los portaobjetos son colocados en una delgada bolsa de plástico termo-sellada y aceite mineral es cuidadosamente adicionado en la bolsa en una cantidad suficiente para rodear los portaobjetos; la bolsa es sellada y puesta en un termociclador. El aceite mineral sirve para estabilizar la transferencia de calor y prever la evaporación de la reacción en solución acuosa. Un controlador térmico es fijado en un portaobjetos en otra bolsa plástica con una cantidad similar de aceite para proveer un ambiente comparable para medir la temperatura de la muestra durante la reacción. Después de 30 ciclos, la bolsa se abre y los portaobjetos se le quita el aceite por inmersión en cloroformo. Cuidando no permitir que el portaobjeto se seque, el cubreobjeto es cuidadosamente retirado, y una adicional alícuota de mezcla de PCR es introducida en la célula o el tejido; el portaobjeto es resellado dentro de la bolsa llena de aceite, y se le da otros 30 ciclos adicionales. Como con cualquier PCR, la optimización empírica de la concentración del primer, concentración de magnesio, temperaturas de alineación y elongación pueden resultar en una mayor eficiencia, la cual, en el caso del PCR *in situ*, resulta en una mejor señal con menos ruido de fondo.

Bibliografía

Bloisi, R.M. 1988. Principles of Immunology and Immunodiagnostic. Ed. Lea/Tebiger.

Bullock, G.R., Petrusz, P. 1989. Techniques in immuno-cytochemistry. Vol. 4, Academic Press.

de Carvalho Gomes, P.A., 2000, Surface plasmon resonance as a tool in the functional analysis of an immunodominant site in foot-and-mouth disease virus, Tesis de doctorado, Universitat de Barcelona

Garcia Vela, J.A., Martin Rubio, I., Hospital Universitario de Getafe, Madrid, <http://www.citometriadeflujo.com/HTML/fundamentos>

Johnstone, A. and Thorpe, R. 1987. Immunochemistry in Practice. 2nd ed.

Kumagai, I., Tsumoto, K., 2001, Antigen-Antibody Binding, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

Lefkovits, I. y Pernis, P. 1997. Immunological Methods. Academic Press, Ed. Harlow, David Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 1988

Liddell, J.E., 2002, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Measure Pure Protein, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

Martínez Pérez, R.D., Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, <http://www.tuobra.unam.mx/publicadas/021031121605.html>

Melamed, M.R., Lindmo, T., Mendelsohn, M.L. 1990. Flow Cytometry and Sorting. Ed. John Wiley & Sons.

Introduction to Antibodies, Chemicon International, Inc., www.chemicon.com USA

PCR station, <http://www.pcrstation.com/in-situ-pcr/>

Peña Martínez, J., Inmunología on-line, Universidad de Córdoba y Sweden Diagnostics, España, <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>

Price, C.P., 2001, Immunoassay, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

Retzel, E.F., Staskus, K.A., Embretson J.E., Haase, A.T., 1994, The *In Situ* PCR: Amplification and Detection in a Cellular Context, Department of Microbiology, University of Minnesota, Minneapolis, <http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/minn/chapter3.7/chapter3.7.fm.html>

Rodkey, L.S., Nisonoff, A., 2001, Haptens, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

Roitt, I.M., Delves, P.J., Immunología, fundamentos, Editorial Medica Panamericana, Argentina, 2003

The Biology Project, University of Arizona,
<http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>

Zola, H., 2001, Monoclonal Antibodies, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

Zola, H., Thomson, P.R., 2001, Monoclonal Antibodies: Diagnostic Uses, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net